

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Daniel Teupser

Zelluläre Internalisierung von Mikropartikeln

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

An der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
Zu München

Vorgelegt von
Géraldine Müller-Stoy
aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Schleicher
PD Dr. Christoph Walz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2013

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
WIDMUNG.....	6
I. EINLEITUNG	1
I.1 ZELLULÄRE MIKROPARTIKEL	1
I.2 TRANSFER VON PLASMAMEMBRANKOMPONENTEN.....	6
I.3 DIE ROLLE VON MIKROPARTIKELN BEI MALIGNEN ERKRANKUNGEN	7
I.4 DIE ROLLE VON MIKROPARTIKELN BEI DER BLUTGERINNUNG	7
I.5 MIKROPARTIKEL UND TF	8
I.6 CLEARANCE VON MIKROPARTIKELN.....	10
I.7 INTERNALISIERUNG VON EXTRAZELLULÄREM MATERIAL DURCH ENDOZYTÖSE	11
I.7.1 Clathrin-abhängige Endozytose.....	11
I.7.2 Clathrin-unabhängige Endozytose.....	12
I.8 PHAGOZYTÖSE	14
I.9 „EAT-ME“-SIGNALE ZUR ERKENNUNG APOPTOTISCHER ZELLEN.....	15
I.10 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
II. MATERIAL UND METHODEN.....	18
II.1 MATERIAL	18
II.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	18
II.1.2 Puffer	18
II.1.3 Materialien zur venösen Blutentnahme.....	19
II.1.4 Chemikalien zur Mikropartikel- und Zellpräparation.....	20
II.1.5 Eukaryontische Zellen.....	21
II.1.6 Plasmide	21
II.1.7 Kultur-und Einfriermedien	21
II.1.8 Geräte	21
II.1.9 Verbrauchsmaterial.....	22
II.2 METHODEN	23
II.2.1 Probanden und Blutabnahme	23
II.2.2 Zellpräparationen	23
II.2.3 Zellkultur	25
II.2.4 Transfer von Mikropartikeln auf Akzeptorzellen.....	26
II.2.5 Messung mittels PH-Methode.....	28
II.2.6 Prinzip der Darstellung von Mikropartikeln in der konfokalen Laserscanmikroskopie	29

Inhaltsverzeichnis

II.2.7	Statistische Auswertung.....	31
III.	ERGEBNISSE	33
III.1	KALIBRIERUNGSKURVE.....	33
III.2	MESSUNG DES PH-WERTES IN ISOLIERTEN MIKROPARTIKELN	34
III.3	PH-MESSUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT BEI 37°C	35
III.4	PH-MESSUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT BEI 4°C	36
III.5	INTERNALISIERUNG VON MIKROPARTIKELN IN THP-1 ZELLEN	37
III.6	HEMMUNG DER MIKROPARTIKEL-INTERNALISIERUNG DURCH CYTOCHALASIN B.....	39
III.7	ZIRKULIERENDE MIKROPARTIKEL UND NEUTROPHILE GRANULOZYTEN.....	41
III.8	AUFNAHME TF-CFP POSITIVER MIKROPARTIKEL IN THP-1 ZELLEN	42
III.9	DYNAMIN-K44A	44
III.10	BEEINFLUSSUNG DER INTERNALISIERUNG DURCH ERKENNUNGSMARKER FÜR DIE PHAGOZYTOTOSE APOPTOTISCHER ZELLEN	45
III.10.1	Annexin V.....	45
III.10.2	Duramycin	46
III.10.3	Anti-Calreticulin-AK	47
III.11	INTERNALISIERUNG VON MIKROPARTIKELN DURCH THROMBOZYTEN	49
IV.	DISKUSSION.....	54
IV.1	ENDOZYTOTOSE DER MIKROPARTIKEL.....	55
IV.2	DIE ROLLE DER AKTIN-POLYMERISATION UND VON DYNAMIN BEI DER MIKROPARTIKEL- ZELL-INTERAKTION	56
IV.3	PHAGOZYTOTOSE VON MIKROPARTIKELN ÜBER DIE ERKENNUNG VON „EAT-ME“-SIGNALEN.....	57
IV.4	INTERNALISIERUNG VON TF IN PLÄTTCHEN DURCH ENDOZYTOTOSE TF-POSITIVER MIKROPARTIKEL.....	59
IV.5	VERSCHIEDENE WEGE DER ZELLULÄREN INTERNALISIERUNG VON MIKROPARTIKELN	61
IV.6	AUSBLICK	62
V.	ZUSAMMENFASSUNG	64
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	65
VII.	ANHANG.....	74
VII.1	DANKSAGUNG.....	74

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Phospholipid-Transporter in der Zytoplasma-Membran. (Frey and Gaipf 2011).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mikropartikel-Bildung und Membranstruktur (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010).....	4
Abbildung 3: Verschiedene Formen der Endozytose (Mayor Pagano 2007).....	14
Abbildung 4: Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie.....	30
Abbildung 5: Kalibrierungskurve; pH-abhängige Fluoreszenz BCECF-markierter Plättchen-Mikropartikel.....	33
Abbildung 6: Fluoreszenz-Quotient isolierter BCECF-gefärbter Thrombozyten-Mikropartikel.....	34
Abbildung 7: pH _i in Thrombozyten-Mikropartikeln nach Inkubation mit THP-1 Zellen.....	35
Abbildung 8: pH _i in Thrombozyten-Mikropartikeln nach Inkubation mit THP-1 Zellen.....	36
Abbildung 9: Vybrant DiD gefärbte THP-1 Zelle nach Aufnahme von DCF gefärbten Thrombozyten-Mikropartikeln.....	38
Abbildung 10: Messung von pH _i in Thrombozyten-Mikropartikeln nach Inkubation mit THP-1 Zellen und Zugabe von Cytochalasin B.....	39
Abbildung 11: Koinkubation von Vybrant DiD gefärbten THP-1 Zellen und DCF gefärbten Plättchen-Mikropartikeln; Hemmung der Internalisierung nach Zugabe von Cytochalasin B.....	40
Abbildung 12: Internalisierung von zirkulierenden Mikropartikeln in neutrophile Granulozyten.....	41
Abbildung 13: TF-CFP; Herstellung der pcDNA.....	42
Abbildung 14: TF-CFP positive Mikropartikel aus TF-CFP-transfizierten CHO-Zellen.....	42
Abbildung 15: THP-1 Zellen und TF-CFP positive Mikropartikel nach 30 min Koinkubation, Z-Stapel, Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke: 0,6µm.....	43
Abbildung 16: Internalisierung von Thrombozyten-Mikropartikeln in U-937 Zellen.....	44
Abbildung 17: Koinkubation von THP-1 Zellen und Thrombozyten-Mikropartikeln; Hemmung der zellulären Aufnahme durch Annexin V.....	45
Abbildung 18: Koinkubation von THP-1 Zellen und Thrombozyten-Mikropartikeln; Hemmung der zellulären Aufnahme durch Duramycin.....	46
Abbildung 19: Koinkubation von THP-1 Zellen und Plättchen-Mikropartikeln; Hemmung der Endozytose durch Anti-Calreticulin-AK.....	47
Abbildung 20: Koinkubation von Vybrant DiD gefärbten THP-1 Zellen und DCF gefärbten Thrombozyten-Mikropartikeln; Hemmung der Internalisierung durch Zugabe von Anti-Calreticulin-AK oder Annexin V.....	48
Abbildung 21: Koinkubation von Thrombozyten und THP-1 Mikropartikeln; Hemmung der Internalisierung durch Zugabe von Cytochalasin B.....	50
Abbildung 22: Interaktion von Thrombozyten mit TF-CFP positiven Mikropartikeln.....	52

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aPTT aktivierte partielle Thromboplastinzeit
 ADP Adenosindiphosphat
 AK Antikörper
 AM Azetoxymethylester
 BCECF 2',7'-bis(2-carboxy-ethyl)-5(und-6)-carboxyfluorescein
 BSA Bovines Serum Albumin
 Ca Calcium
 CCR5 Chemokin (C-C motiv) Rezeptor 5
 CFP Cyan fluorescent protein
 CHO Chinese Hamster Ovary
 DCF 5-(und-6)-carboxyfluorescein diacetate, succimidyl ester(5(6)-CFDA,SE)
 DMSO Dimethylsulfoxid
 DNA Desoxyribonukleinsäure
 Fu Fluoreszenz
 GP Glycoprotein
 HBSS Hanks balanced salt sodium medium
 HIV Human immunodeficiency virus
 ICAM-1 Intracellular Adhesion Molecule
 ITP Idiopathisch thrombozytopenie Purpura
 kDa Kilo Dalton
 LPS Lipopolysaccharide
 LSM Laserscanmikroskopie
 min Minuten
 mRNA Messenger Ribonukleinsäure
 miRNA Micro Ribonukleinsäure
 OCS Offenes canaliculäres System
 PAP Plättchenarmes Plasma
 PBS Phosphate buffered saline
 PBMC Peripheral blood mononuclear cells
 pHi Intramikropartikulärer pH
 PE Phosphatidylethanolamin
 PECAM-1 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

Abkürzungsverzeichnis

PRP Plättchenreiches Plasma

PS Phosphatidylserin

PSGL-1 P-selectin glycoprotein ligand-1

SD Standard deviation, Standardabweichung

Sec Sekunden

TF Tissue factor

TFPI Tissue factor pathway inhibitor

TXA Thromboxan

U Units

vWF von Willebrand Faktor

wt wildtype

Widmung

WIDMUNG

Meiner Familie

I. EINLEITUNG

I.1 ZELLULÄRE MIKROPARTIKEL

Mikropartikel wurden erstmals 1967 in humanem Serum als Membranfragmente oder sogenanntes *Platelet dust* beschrieben (Wolf 1967). In den letzten Jahrzehnten wurde deutlich, dass Mikropartikel von vielen verschiedenen Zellarten abgegeben werden können und dies nicht nur ein zufälliger Nebeneffekt von zellulären Prozessen ist, sondern dass sie eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielen. Mikropartikel sind kleine Membranvesikel, die sowohl Membranbestandteile als auch zytoplasmatische Elemente der Ursprungszelle enthalten und per Definition 0,1-1 µm groß sind. Verschiedene Triggermechanismen wie mechanischer Stress (Diehl, Nagy et al. 2008), Apoptose (Barry, Pratico et al. 1997), (Mallat, Hugel et al. 1999) und Zellaktivierung (Beaudoin and Grondin 1991) können zur Freisetzung von Mikropartikeln führen.

Die Mehrzahl der im Blut gesunder Probanden vorkommenden Mikropartikel entstammt Thrombozyten. Deren Freisetzung findet nach Aktivierung mittels Thrombin, Kollagen oder mechanischem Stress statt (George, Thoi et al. 1982). Auch andere Zellen des vaskulären Systems wie Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen sind in der Lage Mikropartikel zu bilden (VanWijk, VanBavel et al. 2003), (Morel, Hugel et al. 2004). Vermutlich kann jede Zelle in jedem Differenzierungsstadium Stimulationen ausgesetzt sein, die zu einem Abschnüren ihrer Plasmamembran führen und in Folge dessen die Freisetzung von Mikropartikeln induzieren. Diese Fragmente der Membran mit intracytoplasmatischem Material werden in den extrazellulären Raum freigesetzt.

Bis heute ist der Mechanismus der Vesikelfreisetzung nicht vollständig aufgeklärt. Da Mikropartikel aus bestimmten Membranregionen der Ursprungszelle abgeschnürt werden, die durch einen hohen Anteil an Cholesterin charakterisiert sind, sogenannte „lipid rafts“ (Jy, Jimenez et al. 2002), (Biro, Akkerman et al. 2005), scheint deren Bildung ein gerichteter Prozess zu sein (VanWijk, VanBavel et al. 2003).

In der Literatur werden diverse Zellmoleküle beschrieben, die zumindest zu einem gewissen Grad zur Mikropartikel-Bildung beitragen, z.B. kontraktile Proteine (Dainiak,

Einleitung

Riordan et al. 1988). Für die Bildung der Mikropartikel ist auch eine Trennung der Plasmamembran von dem darunter lokalisierten Zytoskelett notwendig. Stark metastatische Zellen, bei denen nur eine geringe Bindung zwischen der Plasmamembran mit dem Zytoskelett (Aktin und Vinkulin) vorliegt (Raz and Geiger 1982), setzen im Vergleich zu nicht metastatischen Zellen vermehrt Vesikel frei (Barz, Goppelt et al. 1985).

Wahrscheinlich spielt bei der Mikropartikel-Bildung ein durch zellspezifische Stimuli ausgelöster intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg in der Elternzelle eine entscheidende Rolle (Barry, Pratico et al. 1997), (VanWijk, VanBavel et al. 2003), (Frey and Gaipf 2011). Während der Zellaktivierung und auch in der terminalen Phase der Apoptose löst sich die asymmetrische Verteilung der Plasmamembran und es kommt zu einer Translokation von PS von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite (Pasquet, Dachary-Prigent et al. 1996) (Abbildung 1). Darauf folgt die Bildung von kleinen Vesikeln, die von der Plasmamembran abgeschnürt werden (Bever, Wiedmer et al. 1992), (Dachary-Prigent, Pasquet et al. 1995)

Die Vesikelbildung von Mikropartikeln benötigt drei Schlüsselenzyme, die die Membrandistribution der Phospholipide modifizieren (Sims and Wiedmer 2001):

- Eine für PS und PE spezifische Flippase (Hugel, Martinez et al. 2005), die diese Phospholipide von der äußeren zur inneren Plasmamembran bewegt und die Phospholipidasymmetrie in inaktivierten Zellen aufrecht erhält;
- eine Floppase, die dieselben Lipide von der inneren Seite zu der äußeren Seite der Membran transportiert, wenn Zellen aktiviert sind oder in die Apoptose gehen;
- und eine Scramblase, die verantwortlich für unspezifische Neuverteilungen von Lipiden innerhalb der beiden Membranblätter verantwortlich ist (sog. scrambling).

In der Tat scheint die Bildung von Mikropartikeln eng mit der Oberflächenexposition von PS assoziiert zu sein (Frey and Gaipf 2011).

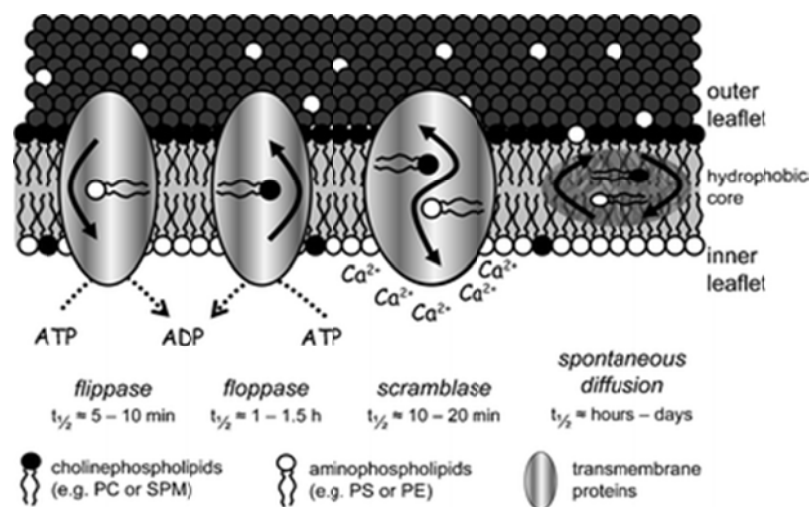


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Phospholipid-Transporter in der Zytoplasma-Membran. (Frey and Gaipf 2011).

Ein ausschließlich unilateraler Transport erfolgt durch die Flippase (von außen nach innen) und die Floppase (von innen nach außen). Beide Transporter sind ATP-abhängig. Die bidirektionale Ca^{2+} -abhängige Scramblase ist ATP-unabhängig.

Die Exposition von PS auf der Plasmamembran ist ein wichtiger Schritt für die Blutgerinnung (Zwaal and Schroit 1997) und stellt ein Erkennungssignal (eat-me-Signal) für die Phagozytose apoptotischer Zellen dar (Fadok, Voelker et al. 1992).

Die Membranen von Mikropartikeln bestehen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen. Deren Zusammensetzung hängt maßgeblich davon ab, von welchen Zellen sie abstammen und welcher zelluläre Prozess ihre Bildung triggert (VanWijk, VanBavel et al. 2003), (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010) (Abbildung 2).

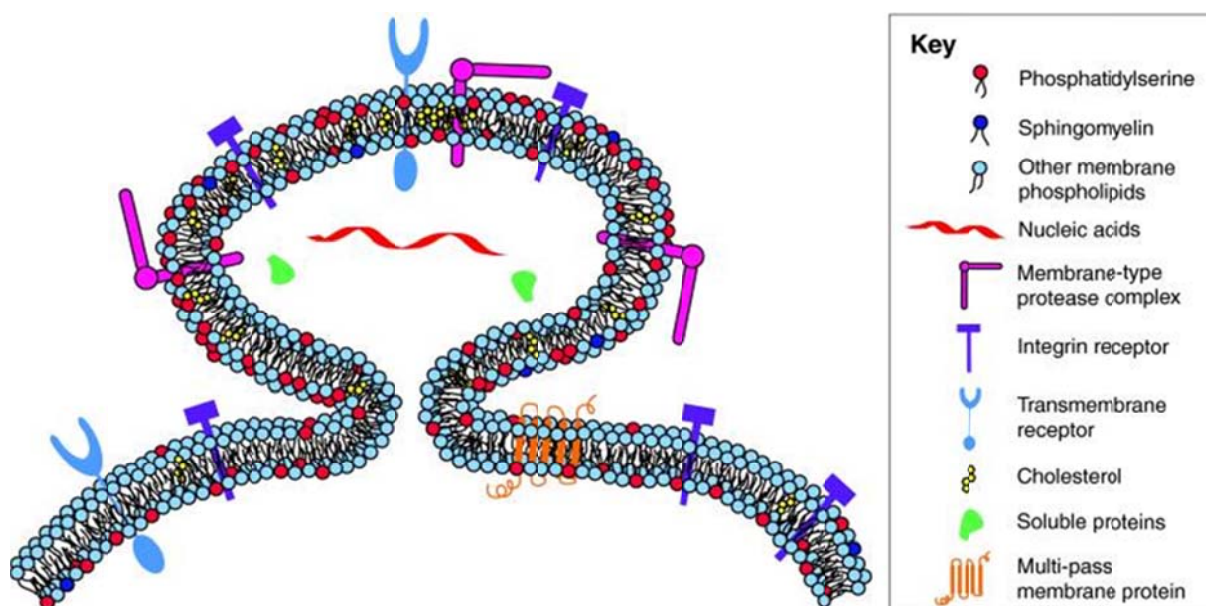


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mikropartikel-Bildung und Membranstruktur (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010)

Mikropartikel entstehen nach Aktivierung der Elternzelle durch das Ausstülpfen der Plasmamembran. Dabei werden negativ geladene Phospholipide auf die äußere Seite der Zellmembran transloziert und in die gebildeten Mikropartikel eingebaut. Die Topologie der Plasmamembran-Proteine entspricht dann derjenigen der Ursprungszelle. Ein Teil der Plasmamembran-Proteine wie z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Integrin-Rezeptoren, MHC I Moleküle und lösliche Proteine wie Proteasen und Zytokine und Nukleinsäuren finden sich auch in der Membran der Mikropartikel.

Mikropartikel bestehen aus einem intravesikulären Teil, der u.a. Nukleinsäuren wie miRNA's und lösliche Proteine beinhaltet (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010), sowie einer sie umgebenden Phospholipid-Bilayer-Membran, in deren Außenseite sich negativ geladene Phospholipide wie PS befinden (VanWijk, VanBavel et al. 2003), (Zwaal, Comfurius et al. 2005), (Hugel, Martinez et al. 2005). Zudem präsentieren sie Antigene und andere zellspezifische Merkmale ihrer Herkunftszelle wie z.B. CD14 auf monozytären Mikropartikeln (Falati, Liu et al. 2003) oder CD42b und den Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa auf Thrombozyten-Mikropartikeln (Sabatier, Roux et al. 2002), (Martinez, Tesse et al. 2005).

Da Mikropartikel aus bestimmten Membranregionen entstehen, entspricht die Zusammensetzung der Proteine auf ihrer Membran nicht derjenigen der allgemeinen Ursprungszelle, sondern ist in Richtung der Proteinkonzentration von „Lipid Rafts“ verschoben (Del Conde, Shrimpton et al. 2005; Pendurthi and Rao 2008).

Einleitung

Zelluläre Mikropartikel haben entsprechend ihrer Herkunft diverse Funktionen. Sie präsentieren unter anderem Adhäsionsmoleküle von aktivierten Plättchen (z.B. P-Selektin) und von Leukozyten (z.B. PSGL-1) sowie für die Hämostase entscheidende Proteine wie TF und TFPI (Muller, Klocke et al. 2003), (Diamant, Tushuizen et al. 2004), (Morel, Toti et al. 2006), (Steppich, Mattisek et al. 2005). Mikropartikel, die im Rahmen der Zellaktivierung entstehen, weisen Eigenschaften einer aktivierten Zellmembran auf (Freyssinet 2003).

Mikropartikel sind involviert bei der Gerinnungsaktivierung, bei Entzündungsreaktionen und beeinflussen die Gefäßfunktion. Da die genannten Prozesse für die Entstehung von Atherosklerose entscheidend sind, wird angenommen, dass Mikropartikel eine erhebliche Bedeutung für die Entstehung und die Progression von kardiovaskulären Erkrankungen wie Myokardinfarkt und Apoplex haben (Mallat, Benamer et al. 2000), (Liu and Williams 2012), (Falati, Liu et al. 2003).

Die klinische Relevanz von Mikropartikeln wurde durch Messungen von Mikropartikel-Konzentrationen im Plasma untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit einem verstärkten Risiko für Atherosklerose im Vergleich zu gesunden Individuen erhöhte Mikropartikel-Fractionen im Blutkreislauf aufwiesen (George, Pickett et al. 1986), (Berckmans, Nieuwland et al. 2001). So konnte in den letzten Jahren bestätigt werden, dass Erkrankungen wie z.B. Diabetes Mellitus, starker Bluthochdruck oder Nierenversagen (Diamant, Nieuwland et al. 2002), (Sabatier, Darmon et al. 2002) mit einem erhöhten Level an Mikropartikeln einhergehen. Das Gleiche gilt auch bei Erkrankungen, die mit arteriellen oder venösen Thrombosen gekoppelt sind wie beispielsweise Karzinom-assoziierte tiefe Venenthrombose (Tesselaar, Romijn et al. 2007), Anti-Phospholipid-Antikörper-Syndrom (Combes, Simon et al. 1999), disseminierte intravasale Gerinnung, Heparin-induzierte Thrombozytopenie (Lee, Warkentin et al. 1996) und thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (Kelton, Warkentin et al. 1992). Die wichtige hämostatische Rolle von Mikropartikeln wird auch durch die Blutungstendenz von Patienten mit Scott-Syndrom deutlich. Diese Erkrankung ist eine seltene genetische Gerinnungsstörung. Sie kommt dadurch zustande, dass eine ungenügende Oberflächenpräsentation von PS zu einer gestörten Vesikelbildung von Plättchen und anderen Blutzellen führt (Zwaal, Comfurius et al. 2004), (VanWijk, VanBavel et al. 2003).

I.2 TRANSFER VON PLASMA-MEMBRANKOMPONENTEN

Unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen werden Oberflächenmoleküle wie z.B. Rezeptoren kontinuierlich und spontan von diversen Zellen des Organismus freigesetzt (Vickers and Remaley 2012). Es wird vermutet, dass Mikropartikel bioaktive Moleküle wie Cytokine, RNAs etc. auf Zielzellen transferieren und dadurch als Vektor für Signale und Informationen von einer Zelle zur anderen dienen. Weil Mikropartikel bereits im Blut zirkulieren, könnten sie nicht nur lokal, sondern auch an entfernten Stellen des Entstehungsortes wirken.

Im Rahmen einer HIV-Infektion können Transmembranproteine wie Nef oder der Chemokinrezeptor CCR5 in Form von Mikropartikeln an andere Zellen transferiert werden und so zu einem Progress der Erkrankung führen (Raymond, Campbell-Sims et al. 2011), (Mack, Kleinschmidt et al. 2000). Einige Studien konnten zeigen, dass die Freisetzung von Mikropartikeln aus malignen Zellen möglicherweise das Fortschreiten von Tumorerkrankungen begünstigt (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010), (Antonyak, Li et al. 2011).

Eine intramikropartikuläre Komponente hat in diesem Zusammenhang in letzter Zeit besonders an Bedeutung gewonnen: miRNAs. Dies sind kurze nicht-kodierende RNAs, die post-transkriptional die Genexpression von mRNAs regulieren, indem sie an die 3'-untranslatierte Region binden und entweder die Hemmung oder den Abbau ihrer Zielgene bewirken. Es konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre miRNAs durch Akzeptorzellen aufgenommen werden und so zu einer Genmodulation in diesen Zellen führen (Zhang, Liu et al. 2010), (Kosaka, Iguchi et al. 2010). Da miRNAs im Plasma gesunder Individuen nachweislich teilweise an Exosomen, apoptotischen Zellkörpern, Lipoproteinen und Mikropartikeln gebunden sind, wird eine wichtige Transportfunktion dieser miRNAs durch lipidreiche Vesikel vermutet (Mause and Weber 2010), (Vickers and Remaley 2012). Dieser Mechanismus könnte helfen, den Einfluss von miRNAs im Bereich der Hämostase, im Lipid- und Cholesterinstoffwechsel und bei der Entstehung von kardiovaskulären und malignen Erkrankungen zu erklären (Najafi-Shoushtari, Kristo et al. 2010), (Schroen and Heymans 2012), (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010).

I.3 DIE ROLLE VON MIKROPARTIKELN BEI MALIGNEN ERKRANKUNGEN

Neuere Studien konnten zeigen, dass die Freisetzung von Mikropartikeln aus Tumorzellen eine entscheidende Rolle für das Fortschreiten einer malignen Erkrankung spielen könnte (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010), (Antonyak, Li et al. 2011). Maligne Mikropartikel enthalten miRNAs und mRNAs (Cocucci, Racchetti et al. 2009). Die Aufnahme von Tumor-Mikropartikeln durch gesunde Stroma-Zellen könnte beispielsweise proangiogenetische Eigenschaften von malignen auf gesunde Zellen übertragen (Hong, Cho et al. 2009; Kosaka, Iguchi et al. 2010; Kawamoto, Ohga et al. 2012). Es wird angenommen, dass Tumor-Mikropartikel auch die extrazelluläre Matrixinvasion unterstützen können (Ginestra, La Placa et al. 1998). Durch *in vitro*-Versuche konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten-Mikropartikel vorübergehend die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und die Sekretion von TNF-alpha und IL-8 hemmen (Sadallah, Eken et al. 2008). Die Regulation und Stimulation des hämatopoetischen Systems durch Mikropartikel könnte insofern das Überleben maligner Zellen beeinflussen, indem eine Erkennung durch das Immunsystem verhindert wird (Valenti, Huber et al. 2007).

I.4 DIE ROLLE VON MIKROPARTIKELN BEI DER BLUTGERINNUNG

Die am besten beschriebene Eigenschaft von Mikropartikeln ist ihre prokoagulatorische Aktivität (Berckmans, Nieuwland et al. 2001), (Nieuwland, Berckmans et al. 1997). Das gerinnungsaktive Potential verschiedener Mikropartikel-Populationen wird hauptsächlich auf TF zurückgeführt (Berckmans, Nieuwland et al. 2001; Biro, Sturk-Maquelin et al. 2003), (Muller, Klocke et al. 2003). Mikropartikel präsentieren TF auf ihrer Oberfläche und können durch Interaktion mit Monozyten die prokoagulante Aktivität von TF verstärken (Eilertsen and Osterud 2005), (Sabatier, Roux et al. 2002). Zusätzlich beeinflussen sie auch die Blutgerinnung indem sie zahlreiche weitere für die Hämostase relevante Rezeptoren und Effektoren wie Selektine, vWF, GPIIb/IIIa, GpIb, TXA2, Arachidonsäure etc. auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Die Blutgerinnung benötigt nicht nur (aktivierte) Gerinnungsfaktoren und Calciumionen, sondern auch Membranen mit negativ geladenen Phospholipiden wie PS. Durch die Präsentation von PS auf der Oberfläche von Mikropartikeln (Zwaal and Schroit

Einleitung

1997), wird die Bindung von aktivierten Gerinnungsfaktoren an der Membran erleichtert, wodurch die Bildung des Tenase (FVIIIa, FIX, FX,PS)-Komplexes sowie Prothrombinase (FVa, FXa, FII,PS)-Komplexes ermöglicht wird (Sims, Wiedmer et al. 1989), (Gilbert, Sims et al. 1991).

Neben ihren direkten Effekten scheinen Mikropartikel auch indirekt das Gerinnungssystem zu beeinflussen. Da sie aus Membranregionen von Monozyten entstehen, die reich an Lipid-Rafts sind und PSGL-1 enthalten, adhärieren sie an aktivierte Plättchen in Thromben und bilden eine Molekülbrücke zwischen PSGL-1 auf Mikropartikeln und P-Selektin auf Plättchen (Falati, Liu et al. 2003). Durch anschließende Fusion von Mikropartikeln mit Plättchen könnten dabei Proteine und Lipide auf die Plättchenmembran übertragen werden (Del Conde, Shrimpton et al. 2005). Des Weiteren triggern P-selectin-präsentierende Plättchen die Expression von TF durch Monozyten (Celi, Pellegrini et al. 1994). Da P-selectin häufig auf Plättchen-Mikropartikeln vorhanden ist, könnten Mikropartikel so die Expression von TF in Monozyten fördern. Auf der anderen Seite exprimieren Mikropartikel auch antikoagulatorische Proteine wie TFPI (Steppich, Mattisek et al. 2005), Protein C (Satta, Toti et al. 1994) und Protein S.

I.5 MIKROPARTIKEL UND TF

TF ist ein glykosyliertes 47 kDa großes integrales Zellmembranprotein der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie und ist der wichtigste Initiator der physiologischen Blutgerinnung. Es wurde lange Zeit angenommen, dass TF vor allem in der Intima (Fibroblasten) und Media (glatte Muskelzellen) der Gefäßwand exprimiert wird (Drake, Morrissey et al. 1989), (Camerer, Kolsto et al. 1996). Eine Gefäßverletzung führt sehr schnell zu einer Aggregation von Plättchen mit dem Subendothel, woraus sich ein Thrombus bildet. Parallel initiiert der aus der Gefäßwand frei gewordene TF mit dem Faktor VIIa die Gerinnungsaktivierung.

Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom oder Diabetes Mellitus wurden erhöhte Konzentrationen an TF im Plasma gefunden (Zumbach, Hofmann et al. 1997), (Suefuji, Ogawa et al. 1997), (Misumi, Ogawa et al. 1998). Eine Reihe neuerer Beobachtungen demonstrierte, dass auch im Blut gesunder Probanden TF-Antigen vorhanden war (Koyama, Nishida et al. 1994), (Albrecht, Kotzsch et al. 1996), (Zumbach, Hofmann et al. 1997), (Giesen, Rauch et al. 1999). Interessanterweise

Einleitung

konnte der im Blut vorhandene, sogenannte intravasale TF auf der Oberfläche von Blutzellen und Mikropartikeln nachgewiesen werden (Giesen, Rauch et al. 1999), (Zillmann, Luther et al. 2001), (Camera, Frigerio et al. 2003), (Engelmann, Luther et al. 2003), (Muller, Klocke et al. 2003). Einen kleineren Anteil scheint der im Mikropartikel-freien Plasma lösliche TF auszumachen. Diese Variante unterscheidet sich jedoch strukturell von der auf Zelloberflächen exprimierten Form. Löslicher TF besitzt nur einen Großteil der extrazellulären, nicht jedoch die membranöse TF-Domäne und entsteht durch alternatives Splicing (Bogdanov, Balasubramanian et al. 2003). Die funktionell aktive Form scheint dagegen die *full length*-Variante zu sein, die auf Zelloberflächen und Mikropartikeln exprimiert ist (Zillmann, Luther et al. 2001), (Muller, Klocke et al. 2003), (Giesen, Rauch et al. 1999).

Unter physiologischen Bedingungen sind Monozyten frei von TF. 15 Minuten nach Aktivierung mit LPS kann jedoch bereits mRNA für TF in Monozyten nachgewiesen werden (Osterud and Bjorklid 2001). In humanem Blut sind Monozyten die wichtigsten Zellen, die befähigt sind, TF nach transkriptioneller Aktivierung *de novo* zu synthetisieren. (Osterud and Bjorklid 2001). Nachdem in Plättchen keine mRNA für TF gefunden werden konnte (Zillmann, Luther et al. 2001), wird angenommen, Plättchen könnten dieses Protein von anderen Zellen internalisieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Transfer von TF von Monozyten auf Plättchen durch Mikropartikel erfolgt (Rauch, Bonderman et al. 2000). Andererseits könnte die TF-Synthese in Plättchen nach Zellaktivierung durch Splicing aus TF prä-mRNA erfolgen (Schwertz, Tolley et al. 2006). Der plättchenassoziierte TF ist vorwiegend in den alpha-Granula und dem offenen kanalikulären System gespeichert (Muller, Klocke et al. 2003). Nach Aktivierung mit Kollagen und Thrombin können Plättchen TF sehr schnell auf der Zelloberfläche präsentieren. Eosinophile Granulozyten speichern TF in spezifischen Granula und weisen unter allen unstimulierten Blutzellen den höchsten Gehalt an TF auf (Moosbauer, Morgenstern et al. 2007).

Auf der Oberfläche von aktivierten Zellen und Mikropartikeln scheint TF zum Großteil in einer inaktiven, der sogenannten *encrypted* form vorzuliegen (Muller, Klocke et al. 2003), (Bach 2006). Er bindet den Faktor VIIa, kann jedoch kaum die Gerinnung initiieren. Es ist anzunehmen, dass unter physiologischen Bedingungen die Verschlüsselung des intravasalen TF eine überschießende Gerinnungsaktivierung verhindert. Neueste Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Konversion von TF von einer kryptischen und inaktiven Form in eine prokoagulatorische Form durch die Bildung einer

Einleitung

Disulfidbrücke zwischen Cys186 und Cys209 vermittelt wird. Dieser Prozess wird *in vivo* von durch Plättchen und Endothelzellen freigesetzte Protein-Disulfid-Isomerase erleichtert (Reinhardt, von Bruhl et al. 2008).

I.6 CLEARANCE VON MIKROPARTIKELN

Plättchen haben eine Lebensdauer von ca. 10 Tagen, hingegen konnten schon 30 min nach der Infusion von Plättchen-Mikropartikeln in Mäuse diese nicht mehr im Blut nachgewiesen werden (Flaumenhaft 2006).

Eine erhöhte Zahl von Mikropartikeln geht mit einem erhöhten thrombotischen Potenzial einher. Ein Beispiel für diese Beobachtung ist, dass splenektomierte Patienten mit ITP höhere Mikropartikel-Level im Plasma und eine kürzere aPTT aufweisen (Fontana, Jy et al. 2008). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass splenektomierte Mäuse eine defekte *Clearance* von zuvor infundierten Tumor-Zell-Mikropartikeln besaßen und sich eine höhere Morbidität und Mortalität als in nicht splenektomierten Kontrollen zeigte (Davila, Amirkhosravi et al. 2008). Diese Studien zeigen, wie wichtig es ist, den Mechanismus, die Einflussfaktoren und die Unterschiede der Mikropartikel-Clearance zwischen verschiedenen Individuen besser zu verstehen.

Einer Hypothese zufolge erfolgt die Clearance der Mikropartikel über einen passiven Prozess der Membranfusion mit den Akzeptorzellen (Whale, Beskorwayne et al. 2006). Interessanterweise wurde in anderen Arbeiten postuliert, dass Mikropartikel mittels Endozytose aufgenommen werden (Kawamoto, Ohga et al. 2012), (Flaumenhaft 2006). Neueste Erkenntnisse sprechen auch für eine Aufnahme über rezeptorvermittelte Phagozytose, wobei PS-reiche Mikropartikel ähnlich wie apoptotische Zellkörper an Lactadherin gebunden und durch Makrophagen phagozytiert werden (Dasgupta, Abdel-Monem et al. 2009), (Rautou and Mackman).

I.7 INTERNALISIERUNG VON EXTRAZELLULÄREM MATERIAL DURCH ENDOZYTOTOSE

Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete Metchnikoff, dass Litmuspartikel, die von Zellen aufgenommen worden waren, sich von blau nach rot verfärbten, was bezeugte, dass diese Zellen die Partikel in saure Kompartimente eingeschlossen hatten (Lewis 1931).

Die Internalisierung durch Endozytose/Phagozytose ist ein fundamentaler Prozess in eukaryotischen Zellen. Hierbei nimmt die Zelle Plasmamembran-komponenten, assoziierte Liganden und Flüssigkeit auf, indem sie das Material mit ihrer Membran umhüllt und es in Vesikel (Endosomen) einschließt. Kleine Zellorganellen, die (saure) hydrolytische Enzyme besitzen, sogenannte Lysosomen, verschmelzen anschließend mit den Vesikeln, um das aufgenommene Zellmaterial zu verdauen. Als solches hat die Endozytose eine Schlüsselrolle in vielen unterschiedlichen Gebieten der Zellbiologie, angefangen mit der Nahrungsaufnahme bis hin zur Regulierung von interzellulärer Signalvermittlung. In der Tat können die aufgenommenen Moleküle sehr unterschiedlich sein und es ist wichtig, die verschiedenen Mechanismen der Internalisierung und deren Regulationsmechanismen zu verstehen.

I.7.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Der bekannteste und vermutlich bis heute am besten verstandene Mechanismus der Endozytose ist die rezeptorvermittelte Endozytose über Clathrin-coated pits. Dieser Prozess wurde erstmals 1964 von Roth und Porter anhand von elektronenmikroskopischen Analysen beschrieben.

Die Bildung von clathrin-coated-vesicles erfolgt über 3 mechanisch definierte Schritte: (1) die Anordnung von Clathrin zu einem polygonalen Netz und die Bildung von coated pits, (2) die Invagination des coated pit und (3) die Abtrennung des Vesikels von der Plasmamembran. Die Clathrin-abhängige Endozytose erfolgt an spezialisierten Orten (coated-pit zones), an denen die konzentrierte Anordnung spezieller, für die Internalisierung erforderlicher Proteine zu einer komplexen Struktur (sog. coated pits) stattfindet. Eine Schlüsselrolle in diesem Prozess spielen (neben Clathrin) Adaptorproteine (AP) und die große GTPase Dynamin.

Einleitung

Die Hülle (*coat*) besteht hauptsächlich aus dem Protein Clathrin, wobei die grundlegende Struktur ein Clathrin-Trimer (Triskelion) ist. Dieses Protein ist wahrscheinlich nicht die treibende Kraft der Vesikelbildung, sondern hat vielmehr die Funktion sich bildende Vesikel zu stabilisieren. *Assembly* oder *accessory* Proteine (AP) befinden sich direkt unter der Clathrinmembran. Ihre Funktion besteht unter anderem darin, das Clathringerüst zusammenzubauen, es an die Membran zu binden, spezielle Liganden für die Internalisierung zu erkennen und diese zu sortieren. AP-2 kooperiert mit Clathrin an der Membran und scheint in fast alle Schritte der Clathrin-abhängigen Vesikelbildung involviert zu sein. Die Funktion von Dynamin besteht in der Abtrennung des reifen Vesikels von der Plasmamembran. Rezeptorvermittelte Endozytose kann konstitutiv oder durch Signaltransduktion erfolgen. Spezielle Rezeptoren wie der LDL-Rezeptor oder der EGF-Rezeptor können ihre Liganden auf der Zelloberfläche erkennen und die Endozytose vermitteln.

Anschließend werden viele dieser über clathrin-coated pits internalisierten Liganden in späten Endosomen oder Lysosomen in einzelne Moleküle degradiert. Hierdurch können die Rezeptoren bis zu hunderte von Malen wiederverwendet werden. Diese Recycling-Mechanismen sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Zusammensetzung verschiedener Organellen und tragen dazu bei, Moleküle mit spezifischen Funktionen zu ihren entsprechenden Kompartimenten zurückzuführen.

I.7.2 Clathrin-unabhängige Endozytose

Lange Zeit wurde angenommen, Clathrin wäre der entscheidende Faktor für die Vesikelbildung an der Plasmamembran und Endozytose könnte ohne die Anwesenheit dieses Proteins nicht stattfinden. Es gibt jedoch gute Belege dafür, dass Säugerzellen multiple Proteine besitzen, die in der Lage sind, die Bildung von endozytotischen Vesikeln unabhängig von Clathrin zu vermitteln. Viele verschiedene Mechanismen der Clathrin-unabhängigen Endozytose wurden identifiziert. Sie unterscheiden sich in der Art der Liganden und in den für den Prozess benötigten Proteinen. Die Regulationsmechanismen sind sehr komplex und bis heute nicht gut verstanden. Obwohl bislang keine zufriedenstellende Klassifizierung existiert, haben Mayor und Pagano eine vereinfachte Einteilung erstellt, die eine übersichtliche Darstellung ermöglicht (Mayor and Pagano 2007) (Abbildung 3). Sie unterschieden zwei große Kategorien der Clathrin-unabhängigen Endozytose: Dynamin-abhängige (DD)

Einleitung

und Dynamin-unabhängige (DI). Weiterhin unterteilten sie die verschiedenen Formen nach den kleinen GTPasen, die Schlüsselrollen in den unterschiedlichen Endozytosewegen haben. Somit ergaben sich die Gruppen: RhoA-reguliert, cdc42-reguliert, Arf6-reguliert und die Aufnahme über Caveolae. Hierbei sind die Proteine nicht spezifisch für einen einzigen Internalisierungsmechanismus, sondern können in unterschiedliche Prozesse involviert sein.

Als wichtige Unterformen der Clathrin-unabhängigen Endozytose seien die Makropinozytose und die Aufnahme über Caveolae genannt. Die Makropinozytose beinhaltet die Bildung von großen endozytotischen Vesikeln (Makropinosomen), die durch Aktin-gesteuerte Einschnürungen der Plasmamembran generiert werden. Sie erlaubt Zellen, große Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit, Antigene und Pathogene aufzunehmen. Die Aufnahme über Makropinozytose ist nicht Rezeptor-vermittelt und relativ unspezifisch.

Caveolae sind charakteristischerweise 50-100nm kleine, regelmäßige Invaginationen der Plasmamembran. Sie stellen eine spezielle Form der „lipid rafts“ dar und bestehen aus cholesterin- und glycosphingolipidreichen Membrandomänen. Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde beobachtet, dass die meisten dieser Caveolae eine Verbindung mit der Oberfläche besitzen. So könnten Caveoleae bspw. eine Rolle bei der Transzytose von Endothelzellen spielen (van Deurs, Roepstorff et al. 2003). Unter normalen Bedingungen sind Caveolae in keinem wichtigen Ausmaß in die Endozytose involviert. Im Gegensatz zur Clathrin-vermittelten Endozytose, bei der die Internalisierung nach ca. 15 min abgeschlossen ist, läuft die Endozytose durch Caveolen wesentlich langsamer (10-20h) ab (Mayor and Pagano 2007).

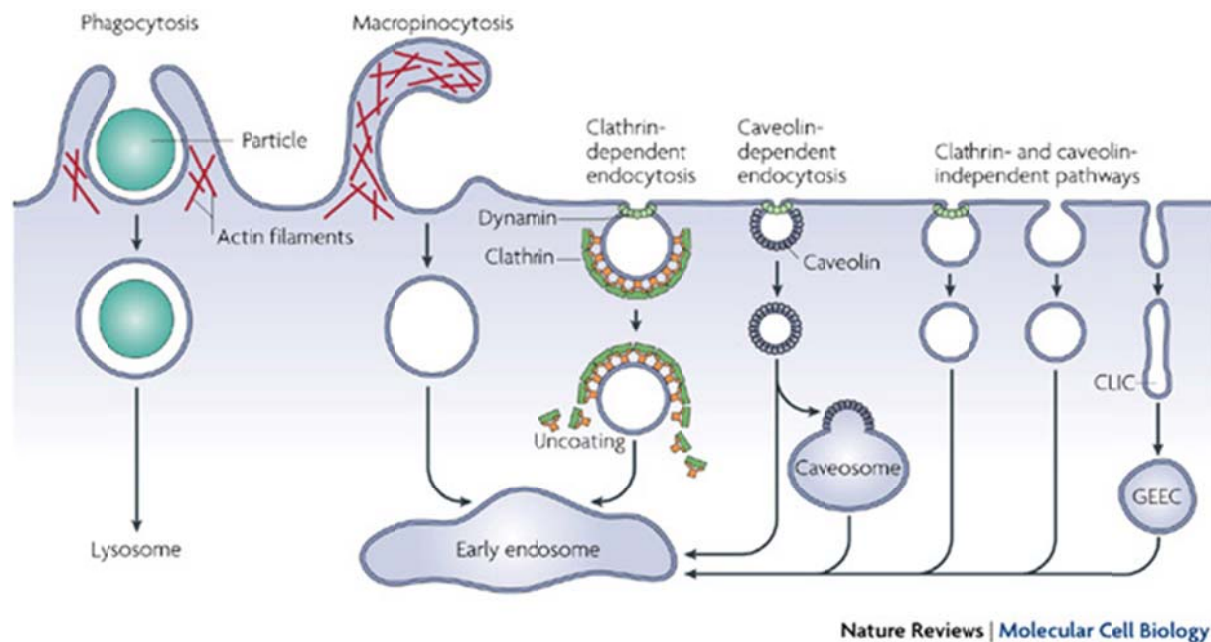


Abbildung 3: Verschiedene Formen der Endozytose (Mayor Pagano 2007)

Partikel können entweder Clathrin-abhängig oder Clathrin-unabhängig aufgenommen werden. Wichtigste Formen der Clathrin-unabhängigen Endozytose sind die Phagozytose, die Makropinozytose und die Aufnahme über Caveolae. Über vesikuläre oder tubuläre Intermediäre werden die aufgenommenen Ladungen den frühen Endosomen zugeführt.

Endosomen nutzen nach ihrer Bildung verschiedene intrazelluläre Wege. Die meisten aufgenommenen Ladungen werden über vesikuläre (clathrin oder caveolin-umhüllte Vesikel) oder tubuläre Intermediäre (von der Membran abstammende Clathrin- und Dynamin-independent carriers, sogenannte CLICs) zu frühen Endosomen transferiert. Von hier aus können sie z.B. zur Plasmamembran rezyklieren oder auch mittels Transzytose durch die Zelle zur gegenüberliegenden Zellmembran wandern und an späte Endosomen weitergegeben werden.

I.8 PHAGOZYTOSE

Die Phagozytose ist ein Clathrin-unabhängiger Prozess und vermittelt die Internalisierung größerer Partikel von min. $0,5\mu\text{m}$ wie beispielsweise Bakterien, Viren, Parasiten, größere Immunkomplexe oder apoptotische Zellkörper.

Bei Säugetieren ist die Phagozytose ein Kennzeichen von Makrophagen, dendritischen Zellen und polymorphkernigen Neutrophilen, wobei diese Zellen eine ent-

Einleitung

scheidende Rolle in Entzündungs- und Immunantworten spielen (Aderem 2003), (Greenberg and Grinstein 2002).

Das Anheften an Phagozyten kann durch unspezifische Bindungskräfte oder unter Beteiligung von Rezeptormolekülen auf der Plasmamembran stattfinden. Zu den spezifischen Phagozytose-Rezeptoren gehören u.a. der LPS-Rezeptor CD14, Rezeptoren für Immunglobulin G, Rezeptoren für Komplementkomponenten, Fibronectin-Rezeptoren und Rezeptoren für das C-reaktive Protein (Huber, Polley et al. 1968), (Reynolds, Kazmierowski et al. 1975).

Für die Erkennung und/oder Aufnahme von apoptotischen Vesikeln sind neben dem LPS-Rezeptor CD14 auch $\beta 1$ Integrine, Scavenger Rezeptoren der Klasse A und B, (u.a. CD36), Lektine, ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor (MER) und ein spezifischer Phosphatidylserin-Rezeptor auf der Phagozytenmembran beteiligt (Fadok and Chimini 2001), (Savill and Fadok 2000). Damit jedoch der Phagozyt zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen unterscheiden kann, bedarf es spezifischer Merkmale. Dazu gehören u.a. die Translokation von PS in das äußere Membranblatt der Zellmembran, Veränderungen des Glykosylierungsmusters und weitere Veränderungen der Zelloberflächen (Savill and Fadok 2000), (Platt, da Silva et al. 1998)

Es ist bekannt, dass Thrombozyten ebenfalls zur Phagozytose befähigt sind. Plättchen können Latexpartikel, Viren und Bakterien über Endozytose aufnehmen bzw. Liposomen über ihr offenes canalikuläres System (OCS) internalisieren (White 1972). Das OCS entsteht durch Invagination der Plasmamembran und dient der Zelle als Membranreserve im Inneren des Thrombozyten (Nishiya and Toma 2004).

I.9 „EAT-ME“-SIGNALE ZUR ERKENNUNG APOPTOTISCHER ZELLEN

Die *Clearance* apoptotischer Zellen durch Phagozyten ist ein sehr effizienter Prozess. Selbst in Geweben mit einer hohen Anzahl an apoptotischen Zellen wie z.B. Knochenmark ist es schwierig, die Apoptose mit traditionellen Methoden nachzuweisen, weil diese Zellen sehr schnell von Makrophagen aufgenommen werden. Die Oberflächenpräsentation von PS, die während des programmierten Zelltodes geschieht, ist das bekannteste Erkennungssignal für Makrophagen (eat-me-signal). Es konnten verschiedene Rezeptoren auf Makrophagen identifiziert werden, die die

Einleitung

Clearance apoptotischer Zellen direkt oder indirekt vermitteln (Fadok and Chimini 2001).

Bestimmte Marker auf apoptotischen Zellen dienen hierbei Phagozyten diese als solche zu erkennen und anschließend zu internalisieren. Als Beispiel sogenannter „eat-me“-Signale seien PS, Annexin I oder auch Veränderungen der Oberflächenmoleküle ICAM-3 und CD31, sowie Änderungen in der Ladung der Zelloberfläche genannt (Fadok, Bratton et al. 2001), (Savill, Dransfield et al. 2002), (Franc 2002), (Moffatt, Devitt et al. 1999), (Brown, Heinisch et al. 2002).

Indirekte „eat-me“-Signale entstehen durch spezifische Interaktionen von Serumproteinen mit der Oberfläche von apoptotischen Zellen (Fadok, Bratton et al. 2001), (Savill, Dransfield et al. 2002), (Franc 2002). Diese extrazellulären Brückenmoleküle wie milk-fat-globule-EGF-factor 8, beta2-Glycoprotein 1, serum protein S und growth arrest-specific 6 binden Phospholipide wie PS auf apoptotischen Zellen und machen sie dadurch, dass sie vermehrte Erkennungsorte für Phagozytenrezeptoren bilden, anfälliger für Phagozytose (Hanayama, Tanaka et al. 2002), (Nagata, Ohashi et al. 1996). Aber auch veränderte Glykosylierungsmuster auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen können die Erkennung und die anschließende Internalisierung erleichtern. So interagieren extrazelluläre Brückenmoleküle auf der Oberfläche apoptotischer Zellen wie surfactant protein A und -D, Mannose-binding-protein und die erste Komponente der klassischen Komplementkaskade C1q mit dem löslichen Molekül Calreticulin (CRT), bevor Calreticulin an das LDL-receptor-related protein auf dem Phagozyten bindet (Ogden, deCathelineau et al. 2001), (Vandivier, Ogden et al. 2002), (Paidassi, Tacnet-Delorme et al. 2011).

Des Weiteren können lebende Zellen ihre Internalisierung aktiv verhindern, indem sie Phagozyten sogenannte „don't-eat-me“-Signale präsentieren. Als solche sind beispielsweise CD31 auf Leukozyten und CD47 auf Erythrozyten bekannt (Brown, Heinisch et al. 2002), (Oldenborg, Zheleznyak et al. 2000). Über einen bisher unbekannten Mechanismus können diese Marker nach dem Zelltod ihre Fähigkeit zur Abstoßung von Phagozyten verlieren und sogar als Anziehungsmarker fungieren (Brown, Heinisch et al. 2002).

Diese „eat-me“- und „don't-eat-me“-Signale finden allerdings nur Anwendung, wenn Phagozyten und apoptotische Zellkörper in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass spezifische „come-get-me“-Signale wie bei-

spielsweise Lysophosphatidylcholin die Migration von Phagozyten zum Ort der apoptotischen Zellen fördern (Lauber, Bohn et al. 2003).

I.10 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Mikropartikel sind im Blut gesunder Individuen nachzuweisen. Einige Erkrankungen gehen mit erhöhten Blutkonzentrationen dieser Mikropartikel einher. Es ist bislang unklar, ob hierbei zu viele Mikropartikel gebildet oder zu wenige eliminiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Internalisierung von Mikropartikeln durch Akzeptorzellen genauer untersucht und der Transfer der Mikropartikel auf andere Zellen auf molekularer Ebene analysiert werden.

Dabei ergaben sich einige grundlegende Fragestellungen:

- 1.) Durch welche Mechanismen werden Mikropartikel von Akzeptorzellen internalisiert? Spielt hierbei die Fusion mit der Plasmamembran der Akzeptorzelle oder die Endozytose die entscheidende Rolle?
- 2.) Mikropartikel besitzen auf ihren Membranen die Oberflächenmoleküle PS und PE, wie sie auf apoptotischen Zellen zur Erkennung durch Phagozyten präsentiert werden. Können Mikropartikel wie apoptotische Zellpartikel von professionellen Phagozyten erkannt und phagozytiert werden?
- 3.) Thrombozyten können nach Zellaktivierung TF auf der Membranaußenseite präsentieren. Ist die Internalisierung von Mikropartikeln an der Übertragung von TF auf Thrombozyten beteiligt?

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 MATERIAL

II.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
EDTA (freie Säure)	Roth (Karlsruhe)
D-Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (TNC)	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Roth (Karlsruhe)

II.1.2 Puffer

PBS:

NaCl, 137 mM

KCl, 2,7 mM

NaH₂PO₄·2H₂O, 8 mM

KH₂PO₄, 1,5 mM

in Aqua bidest, pH 7,4

Material und Methoden

Resuspuffer:

NaCl, 138 mM

KCl, 2,7 mM

NaHCO₃, 12 mM

NaH₂PO₄·2H₂O, 0,4 mM

D-Glucose, 5 mM

MgCl₂·6H₂O, 1mM

Hepes, 5 mM

in Aqua bidest, pH 7,4

Thrombozytenwaschpuffer mit Apyrase:

NaCl, 138 mM

KCl, 2,7 mM

MgCl₂, 1 mM

Hepes, 15 mM

EDTA, 2,1 mM

D-Glucose, 5 mM

Tri-Natriumcitrat, 14 mM

Apyrase, 200 U

in Aqua bidest, pH 6,3

Kalibrierungspuffer:

Hepes, 10 mM

KCl, 140 mM

MgCl₂, 1mM

in PBS

II.1.3 Materialien zur venösen Blutentnahme

Tri-Natriumcitrat TNC

Roth (Karlsruhe)

Revasc (Desirudin)

Roth (Karlsruhe)

Einmalspritzen 5, 10, 20 ml

Braun (Melsungen)

Butterfly, 21 G x 3/4" , 0,8 x19 mm

Braun (Melsungen)

II.1.4 Chemikalien zur Mikropartikel- und Zellpräparation

ADP	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Annexin V	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Apyrase Grade VII, Kartoffel	Becton Dickinson (Heidelberg)
BCECF-AM	Sigma (Deisenhofen)
BSA Bovines Serum Albumin	Molecular probes/Invitrogen (Oregon, USA)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth (Karlsruhe)
Calcein-AM	Sigma (Deisenhofen)
Anti-Calreticulin-AK	Molecular probes (Oregon, USA)
Cytochalasin B	Sigma (Deisenhofen)
DCF 5- carboxyfluorescein Diacetate succinimidyl ester	Sigma (Deisenhofen)
Dextran T 500 (MW 500000)	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
DMSO	Novartis/Rhone (Rhone-Polenc Rorer, Frankreich)
Fibrinogen	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Ficoll-Paque Plus (Dichte 1.077g/ml)	Amersham Biosciences (Freiburg)
HANKS B.S.S-Medium	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
Iloprost	Schering AG Berlin
Kollagen Typ I (Kollagenreagenz Horm)	Nycomed Amersham (Ismaning)
Lipofectamine 2000	Schering AG (Berlin)
Lipopolysaccharide from E.coli (LPS)	Nycomed Amersham (Ismaning)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Nigericin	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
PBS	Sigma (Deisenhofen)
Pen/Strep	Molecular probes (Oregon, USA)
Polylysine	Sigma (Deisenhofen)
Thrombin	Sigma (Deisenhofen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Vybrant DID	Molecular probes (Oregon, USA)

II.1.5 Eukaryontische Zellen

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
THP-1 Zellen	CCL-61	ATCC
U-937 Zellen	CRL-1593.2	ATCC
CHO-Zellen	CCL-61	ATCC

II.1.6 Plasmide

TF-CFP-Plamid	AG Engelmann
Dynamin2 K44A-Plasmid	Hospital for sick children

II.1.7 Kultur-und Einfriermedien

Hanks BSS Medium	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
RPMI 1640 Medium with L-Glutamin mit 10% FBS	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
und Pen / Strep	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

II.1.8 Geräte

Axiovert 100 Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Coulter counter	Amersham Biosciences (Freiburg)
Laserscan LSM	Zeiss (Oberkochen)
Feinwaage SBC 21	Scaltec(Heiligenstadt)
PH-Glaselektrode HI 1131	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein)
PH-Meter HI 221	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein)
Spektrophotometer UV-1202	Shimadzu (Duisburg)
Neubauer Zählkammer	Hecht KG (Sondheim)
Ultraschall-Gerät Branson Sonifier	Heinemann (Schwäbisch-Gmünd)
Cell disrupter B-15	

Material und Methoden

Vortex Genie 2	Bender und Hebei (Zürich, Schweiz)
Waage MC1 LC 620 S	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad GFL 1083	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Zentrifuge Mikro 32 R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Universal 32	Hettich (Tuttlingen)

II.1.9 Verbrauchsmaterial

BD disgard II Spritzen	Becton, Dickinson (Heidelberg)
Bulk Diamond Tips	Gilson (Bad Comberg)
Cutasept F Hautdesinfizienz	BODE Chemie (Hamburg)
Deckgläser D, 12 mm	Roth (Karlsruhe)
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt (Gelnhausen)
Eppendorf Reaktionsglas	Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)
Eppendorf Reaktionsglas 3810X, 1,5ml, rot	Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)
Falcon blue max jr. Röhrchen	Greiner Labortechnik (Kremsmünster, Österreich)
Gewebekulturflaschen	Schubert und Weiss (München)
250 ml	
750 ml	
Mikroküvetten 101-QS	Hellma (Müllheim/Baden)
Schichtdicke 10 mm Quarzglas	
Mikrotest, Gewebekulturplatte 12 Well	Becton Dickinson (Heidelberg)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Polypropylene conical tubes 10 mL	Becton Dickinson (Heidelberg)
Pipetman Pipetten	Abimed-Langenfeld
Pipetus Akku Pipetierhilfe	Abimed-Langenfeld
Sterile glass bottom dishes, 35x19x22 mm	Harry Fein world Precision Instruments (Berlin)
Stripette 5 ml, 10 ml	Corning (München)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche 50 mL	Becton Dickinson (Heidelberg)

II.2 METHODEN

II.2.1 Probanden und Blutabnahme

Die venöse Blutentnahme erfolgte an gesunden Spendern, die eine Einverständniserklärung abgegeben und mindestens 2 Wochen vor der Blutentnahme keine anti-thrombozytär-wirksamen Präparate eingenommen hatten. 20 ml-Spritzen wurden mit TNC (Endkonzentration 0,38%) und 1 µg/ml Desirudin gefüllt, bevor nach ausreichender Hautdesinfektion mit einer „Butterfly“-Kanüle das venöse Blut aus einer Armbeuge abgenommen wurde. Anschließend wurde das Blut auf Zentrifugenröhrchen verteilt. Die Isolierung der einzelnen Blutkomponenten wird in den Protokollen II.2.2.1 bis II.2.2.4 beschrieben.

II.2.2 Zellpräparationen

II.2.2.1 Isolierung von Thrombozyten aus Vollblut

Das citrierte Vollblut (siehe Protokoll II.2.1) wurde zur Gewinnung von reinem Plasma 15 min lang bei 268 x g und 24° C zentrifugiert. Zwei Drittel des Überstandes (sogenanntes PRP) wurde abgenommen und jeweils mit Apyrase 0,1U/ml und dem Prostacyclin-Analogon Iloprost (1 ng/ml) versetzt. PRP wurde dann für 10 min bei 268 x g und 24°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Plättchen-pellet in 1 ml Thrombozytenwaschpuffer resuspendiert, bevor es erneut für 10 min bei 268 x g zentrifugiert wurde. Die Plättchen wurden in der gewünschten Menge Resuspensionspuffer aufgenommen und anschließend wie im Protokoll II.2.3.2 beschrieben ausgezählt.

II.2.2.2 Mikropartikel-Bildung aus Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll (II.2.2.1) isoliert. Durch Inkubation von 2×10^8 Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin und 8 µg/ml Kollagen für 30 min bei 37°C wurde die Produktion von ca. 1×10^7 Mikropartikeln pro Ansatz angeregt. Das hatten Vorversuche mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting-FACS) gezeigt. Anschließend wurden die Zellen für

Material und Methoden

15 min bei 3215 x g bei 24°C zentrifugiert, der komplette Mikropartikel-reiche Überstand abgenommen und das Zellpellet verworfen. Jeweils 250 µl des Überstandes wurden dann in ein lichtdichtes, rotes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 30 min bei 17740 x g und 24°C zentrifugiert. Dann wurden 225 µl Überstand vorsichtig abgenommen, das in den übrigen 25 µl verbliebene Mikropartikel-Pellet wurde in 225 µl PBS aufgenommen und erneut bei 17740 x g, 24°C für 30 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand komplett abgenommen, die sich am Gefäßboden befindlichen Mikropartikel wurden in 25 µl Resuspuffer resuspendiert.

II.2.2.3 Mikropartikel-Isolierung aus Vollblut

Zur Mikropartikel-Bildung wurde citriertes Vollblut nach dem unter II.2.1 beschriebenen Protokoll entnommen. Das Blut wurde in 10 ml Reagenzgläser überführt und für 15 min bei 263 x g und 24°C zentrifugiert. Anschließend wurden zwei Drittel des Überstandes (sogenanntes PRP) abgenommen und mit 1 µl/ml Iloprost versetzt. Nach zweimaligem Zentrifugieren für jeweils 20 min bei 1430 x g konnte das PAP als Überstand vom Zellsediment getrennt werden. Aus dem Sediment des PAPs erhielt man nach zweifacher Zentrifugation für jeweils 30 min bei 17750 x g das Mikropartikel-Pellet. Die Mikropartikel wurden anschließend in die gewünschte Menge an Resuspensionspuffer aufgenommen.

II.2.2.4 Isolierung von neutrophilen Granulozyten nach der Dextran-Methode

Die Isolierung von neutrophilen Granulozyten erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Boyum (1968) aus citriertem Vollblut. Mittels Dextran-Sedimentation wurde das Vollblut von Erythrozyten gereinigt. Die Neutrophilen-Anreicherung konnte durch anschließende Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation erreicht werden. Für die Sedimentation der Erythrozyten wurde Vollblut mit Dextran (3% in HBSS, 2:1) gemischt. Nach etwa 30-45 min erfolgte die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (1:1, 160 x g, 30 min) zur weiteren Separation aus dem Überstand. Dabei setzten sich Granulozyten, Erythrozyten und tote Zellen als Sediment ab. Nach dem Waschvorgang mit HBSS bei 110 x g für 10 min wurden die verbliebenen Erythrozyten mit 1ml Aqua bidest lysiert. Anschließend wurde erneut in HBSS bei 110 x g für 10 min zentrifu-

giert. Die Neutrophilen wurden dann in Resuspensionspuffer aufgenommen. Durch diese Methode wurde eine ca. 95%ige Reinheit der Neutrophilen erzielt.

II.2.3 Zellkultur

Die Kultivierung der monozytären Suspensionszelllinien THP-1 und U937 erfolgte in einem Zellkulturschrank bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium (RPMI 1640 mit Penicillin/Streptomycin) in liegenden Zellkulturflaschen mit 50 ml Gesamtvolumen aufgenommen. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Um eine Zelldichte von etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml aufrechtzuhalten, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen nach der in II.2.3.2 beschriebenen Methode gezählt und bei Überschreitung der Zelldichte im Verhältnis 1:1 geteilt. Die Entnahme der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Flow.

II.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die in RPMI/Pen/Strep-Medium kultivierten Zellen wurden 10 min lang bei 150 x g und 24°C zentrifugiert. Nach Auszählung der Zellen mittels Zählkammer wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 1 ml kaltem (4°C) Einfriermedium (5%DMSO in RPMI) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C, nachdem die Zellen in einem Cryo-freezing-Container eingefroren worden waren.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch langsames Erwärmen der Zellsuspension im Wasserbad bis auf 37°C. Anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen mit auf 37°C temperiertem RPMI/Pen/Strep-Medium überführt. Nach 24 Stunden wurden die Reste des DMSO durch einen Mediumwechsel entfernt.

II.2.3.2 Zählen der Zellen

Für die Zählung wurde eine 1:10-Verdünnung der Zellsuspension mit Rhesuspuffer hergestellt und mit dem gleichen Volumen an 0,05%iger Trypanblau-Lösung gemischt. Anschließend wurden 2 µl des Gemisches zur Auszählung mit einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Mit dem Mikroskop wurden immer 4 Quadranten der Zählkammern ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte

Material und Methoden

anhand des definierten Volumens die Zellzahl der Ausgangssuspension ermittelt werden. Außerdem ermöglichte die Mikroskopie die Beurteilung der Zellvitalität.

II.2.3.3 Transfektion der Zellen

Für die Transfektion der Zellen wurde 1 µg DNA(Plasmid) mit 2,5 µl Lipofectamine und 100 µl RPMI für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. 4×10^5 Zellen wurden nach den 30 min mit dem Transfektionsansatz und weiteren 400 µl RPMI aufgenommen und in Zellkulturflaschen in den Zellkulturschrank gegeben. Nach fünf Stunden wurden 5 ml RPMI (mit 20% FBS) zugegeben und für weitere 24 Stunden im Zellkulturschrank kultiviert.

II.2.3.4 Mikropartikel-Bildung aus THP-1 oder U-937 Zellen

Vorversuche mittel Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting-FACS) zeigten, dass $3,2 \times 10^7$ stimulierte THP-1 Zellen ca. 1×10^7 Mikropartikel abgeben. Für die Gewinnung von 1×10^7 Mikropartikel aus THP-1 oder U-937 Zellen wurden $3,2 \times 10^7$ Zellen gezählt und in lichtdichte Eppendorf Tubes gegeben. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml LPS für 16 Stunden bei 37° C im Zellkulturschrank angeregt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 3215 x g bei 24°C zentrifugiert und der mikropartikelreiche Überstand abgenommen. Jeweils 250 µl des Überstandes wurden dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 17740 x g und 24°C zentrifugiert. Dann wurden 225 µl Überstand vorsichtig abgenommen, das in den übrigen 25 µl übrig gebliebene Mikropartikel-Pellet in 225 µl PBS gewaschen und erneut bei 17750 x g, 24°C für 30 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand komplett abgenommen, und die sich am Gefäßboden befindlichen Mikropartikel wurden in Resuspensionspuffer aufgenommen.

II.2.4 **Transfer von Mikropartikeln auf Akzeptorzellen**

Die Aufnahme von Mikropartikeln durch Akzeptorzellen wurde durch Koinkubation von isolierten Mikropartikeln mit THP-1 Zellen, U-937 Zellen, neutrophilen Granulozyten oder Thrombozyten bestimmt. Um die Einflüsse verschiedener Reagenzien und Antikörper sowie die genetische Modulation durch Plasmidtransfektion auf den

Material und Methoden

Transfer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Versuchsansätze ausgeführt. Einerseits wurden die Akzeptorzellen oder die Mikropartikel mit hemmenden Substanzen vorinkubiert, zum anderen wurden die Akzeptorzellen auch mit Plasmiden transfiziert, die den Ablauf bestimmter molekularer Prozesse beeinflussen sollten.

Die Mikropartikel-Suspension wurde zu einer zuvor präparierten Zelllösung der unterschiedlichen Akzeptorzellen hinzugefügt, dazu wurden immer 1×10^7 Mikropartikel mit 1×10^5 Akzeptorzellen pro Ansatz verwendet.

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Internalisierung zu messen, wurden verschiedene Substanzen zum Mikropartikel-Zell-Gemisch hinzugefügt:

- (a) Zugabe von 1,5 μ l/100 μ l Cytochalasin B
- (b) Zugabe von 0,5 μ M Duramycin
- (c) Zugabe von 1 μ M Annexin V+1,5 mM CaCl_2
- (d) Zugabe von 10 μ g/ml Anti-Calreticulin-Antikörper

Alternativ wurden U-937 Zellen mit dem Plasmid Dynamin-K44 A transfiziert (Analog Protokoll II.2.3.3), bevor die Mikropartikel-Suspension hinzugefügt wurde.

Das Zellsuspension- und Mikropartikelgemisch wurde anschließend in lichtdichten Eppendorftubes bei 37°C im Wasserbad inkubiert. In unterschiedlichen Zeitabständen (0 min, 10 min, 30 min) wurden die Ansätze aus dem Wasserbad entnommen und bei 268 x g, 24°C, 10 min lang zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt genügt, um die Zellen zu sedimentieren, ist aber nicht ausreichend, um die leichten Mikropartikel zu pelletieren. Dazu wäre eine Zentrifugation bei 17740 x g für 30 min nötig. Somit war gewährleistet, dass nur die Mikropartikel, die auch an THP-1 Zellen gebunden waren, erfasst werden. Die ungebundenen Mikropartikel wurden mit dem Überstand verworfen und das Pellet in 1ml PBS aufgenommen.

II.2.5 Messung mittels PH-Methode

II.2.5.1 Prinzip

Die Vorstellung, dass Mikropartikel von Akzeptorzellen durch Endozytose internalisiert werden, ließ darauf schließen, dass diese in Endosomen eingeschlossen werden, die anschließend mit Lysosomen verschmelzen. Diese Lysosomen besitzen lytische Enzyme und einen niedrigen pH (ca. 5,5). Somit müsste, im Falle einer Endozytose, der pH der Mikropartikel nach der Internalisierung sinken.

Eine Möglichkeit, den intrazellulären pH zu bestimmen, besteht darin, Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF zu markieren, der abhängig vom pH fluoresziert. Die Fluoreszenz kann dann im Spektrofluorophotometer gemessen werden.

II.2.5.2 BCECF

BCECF ist ein ungeladener Ester des Farbstoffs (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5,6-Carboxyfluorescein acetoxymethyl ester, BCECF-AM), der selbst vier polare Carboxylgruppen trägt und deswegen biologische Membranen schlecht passieren kann. Durch die Bindung an ein Azetoxymethylester entsteht ein unpolares Molekül. Solange BCECF-AM ungeladen ist, diffundiert es durch die Zellmembran und gelangt somit in die Zelle. BCECF-AM fluoresziert selbst kaum. Innerhalb der Zelle spalten jedoch unspezifische Esterasen die Ester-Bindung und setzen BCECF frei (Draper, Martell et al. 1997), (Hirohashi, Terasaki et al. 1997), (Allen, Harpur et al. 1990). Dieser Farbstoff leuchtet dann abhängig vom pH-Wert.

II.2.5.3 Labeln der Mikropartikel mit BCECF

Die Isolierung von Mikropartikeln aus Thrombozyten erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurden 16 µmol/l BCECF-AM hinzugefügt und die Suspension im lichtdichten Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Um den überschüssigen Farbstoff zu eliminieren, wurden sie dann für 30 min mit 17740 x g bei 24°C zentrifugiert, das Mikropartikel-Pellet in PBS gewaschen, erneut für 30 min bei 17740 x g zentrifugiert, in Resuspuffer aufgenommen und schließlich mit den entsprechenden Zellen laut Protokoll II.2.4 koinkubiert.

II.2.5.4 pH-Messung

Die Intensität der Fluoreszenz von BCECF wurde mit einem Spektrofluorophotometer mit einer Exzitations-Wellenlänge von 490/440 nm und einer Emissionswellenlänge von 516 gemessen. Der Quotient der Fluoreszenz von BCECF bei 490-440 nm ist eine Funktion des pH-Wertes. Die Küvette wurde während der Messung im Wasserbad bei 37° C temperiert. Der Fluoreszenzquotient wurde mit Excel berechnet.

II.2.5.5 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte mit der Kalium-Nigericin-Methode. Hierbei wurden 1×10^7 Mikropartikel mit 16 $\mu\text{mol/l}$ BCECF gefärbt und mit 10 μl Nigericin und 3 ml Kalibrierungspuffer in der Messküvette suspendiert. Nigericin kann als Ionophor den Austausch von monovalenten Kationen über biologische Membranen katalysieren und so einen raschen Ausgleich von extra-und intramikropartikulärem pH vermitteln. Der Kalibrierungspuffer hatte in etwa den gleichen Kaliumgehalt wie intrazellulär. Die Nigericin-Mikropartikel-Suspension wurde für 15 min bei 37°C äquilibriert. Danach wurde der pH mittels einer Glaselektrode gemessen. Der Fluoreszenzquotient wurde für pH-Werte im Spektrum von 5,6 bis 7,7 im Spektrofluorophotometer gemessen. Die Einstellung der unterschiedlichen pH-Werte geschah durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen von 1 Mol NaOH oder 1 Mol HCl und im Wasserbad bei 37°C. Während der gesamten Kalibrierung wurden die BCECF-gefärbten Mikropartikel vom Licht abgeschirmt.

II.2.6 Prinzip der Darstellung von Mikropartikeln in der konfokalen Laserscanmikroskopie

Der Vorteil der konfokalen Laserscanmikroskopie (LSM) liegt darin, Fluorophore selektiv in einer einzigen Ebene zu erfassen. Die Lochblenden sorgen dafür, dass sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, von dem Detektor ausgeblendet, also nicht registriert wird (Abbildung 4).

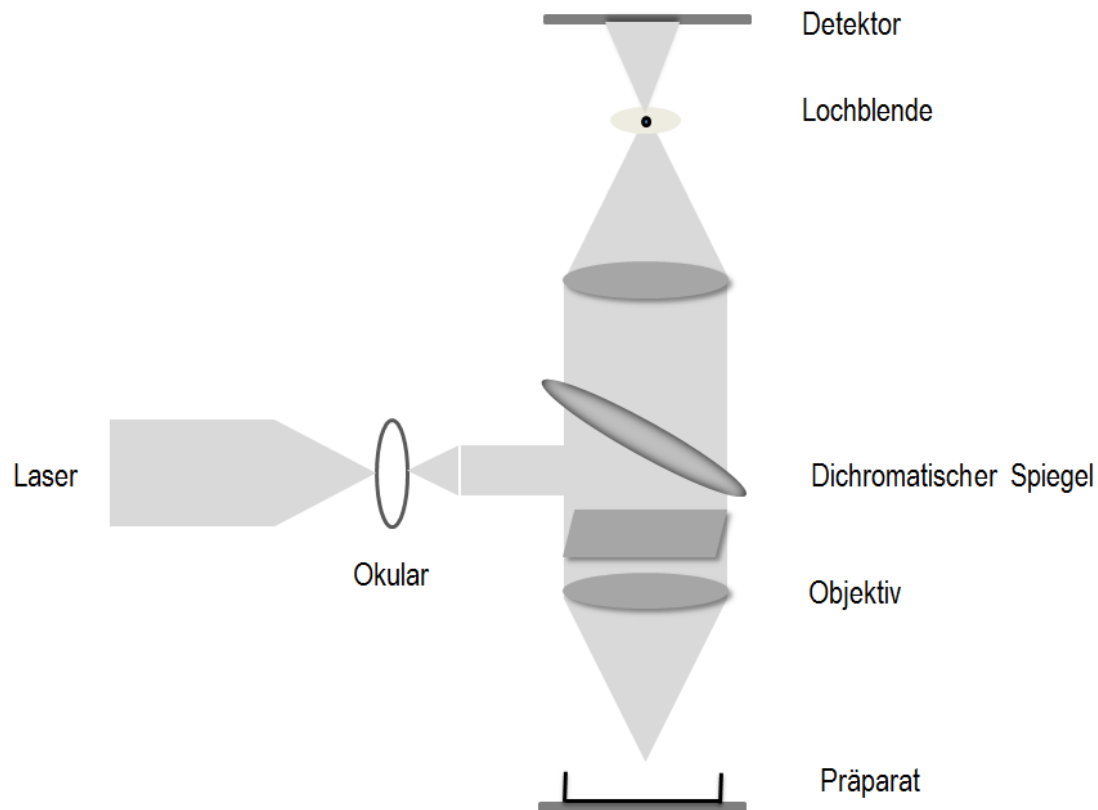


Abbildung 4: Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie

Eine dreidimensionale Darstellung entsteht dadurch, dass das Verschieben der Fokusebene verschiedene optische Schnittbilder fotografiert, die anschließend mit der entsprechenden Software zusammengesetzt werden können. So ermöglicht uns die Laserscan-Mikroskopie nicht nur die Darstellung der sehr kleinen Mikropartikel, sondern auch die Lokalisation der fluoreszierenden Partikel in Bezug auf die koinkubierten Zellen. In unserem Fall war hierbei die Fragestellung von besonderer Bedeutung, ob die fluoreszenzmarkierten Mikropartikel auf der Zellmembran der Akzeptorzellen haften oder bereits internalisiert wurden.

II.2.6.1 Färbung der Mikropartikel mit DCF

Mikropartikel wurden laut Protokoll II.2.2.2 aus Thrombozyten isoliert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF, der eine Emissionswellenlänge von 534 nm besitzt, markiert. Zu 100 µl Mikropartikel-Suspension wurden 2 µl einer DCF-Lösung gegeben und bei Dunkelheit für 10 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wur-

Material und Methoden

den die Proben bei 17740 x g, 24°C 30 min lang zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Mikropartikel-Pellet mit PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand komplett abgenommen und das Mikropartikel-Pellet in 120 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen.

II.2.6.2 Färbung der Akzeptorzellen mit Vybrant DiD

Zur Färbung von THP-1 Zellen oder Thrombozyten mit Vybrant DiD wurden zu 800 µl Zellsuspension 4 µl der Vybrant DiD-Lösung gegeben und bei Dunkelheit für 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 268 x g, 24°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Danach erfolgte eine zweite Zentrifugation für 15 min bei 268 x g und 24°C. Der Überstand wurde dann komplett abgenommen und das Zellpellet in Resuspendierungspuffer aufgenommen.

II.2.6.3 Erstellung von TF-CFP positiven Mikropartikeln aus CHO-Zellen

Für die Erstellung von TF-positiven Mikropartikeln wurden CHO-Zellen wie im Protokoll II.2.3.3 transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Transfektionsschalen aus dem Kulturschrank entnommen, das Medium komplett abpipettiert und die Schalen jeweils mit 2 ml PBS beschichtet. Durch die Verwendung eines Ultraschall-Gerätes wurde dann bei den adhärennten Zellen mechanischer Stress ausgeübt. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette abgezogen und von der Suspension wurden jeweils 250 µl in ein Eppendorfgefäß gefüllt und bei 17740 x g, 24°C für 30 min zentrifugiert. Dann wurden 225 µl Überstand vorsichtig abgenommen, das Mikropartikel-Pellet in 225 µl PBS aufgenommen und erneut bei 17740 x g, 24°C für 30 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand komplett abgenommen, die sich am Gefäßboden befindlichen Mikropartikel in 25 µl Resuspensionspuffer resuspendiert und in den verschiedenen Assays eingesetzt.

II.2.7 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2000 zur Ermittlung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Prozentzahlen weiterverar-

Material und Methoden

beitet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der one way ANOVA-Test der Software SigmaStat verwendet. Bei den durchgeführten statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) zu Grunde gelegt.

III. ERGEBNISSE

III.1 KALIBRIERUNGSKURVE

Um die Mikropartikel-Aufnahme in Akzeptorzellen zu erfassen, wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht mittels mikropartikel-assoziiierter pH-Veränderungen deren zelluläre Internalisierung zu erfassen.

Mikropartikel wurden mit BCECF angefärbt und die Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen vesikulären pH-Werten im Spektrofluorophotometer gemessen. Aus den dabei erhaltenen Fluoreszenzquotienten wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Dabei zeigte sich, dass die zur Ermittlung des pH-Wertes erforderlichen Fluoreszenzquotienten in einem pH-Bereich zwischen 6,2 bis 7,4 weitgehend eine lineare Abhängigkeit von dem intravesikulären pH aufwiesen (Abbildung 5). Daher konnten diese Kalibrierungskurven zur Auswertung und Analyse der nachfolgenden Experimente verwendet werden.

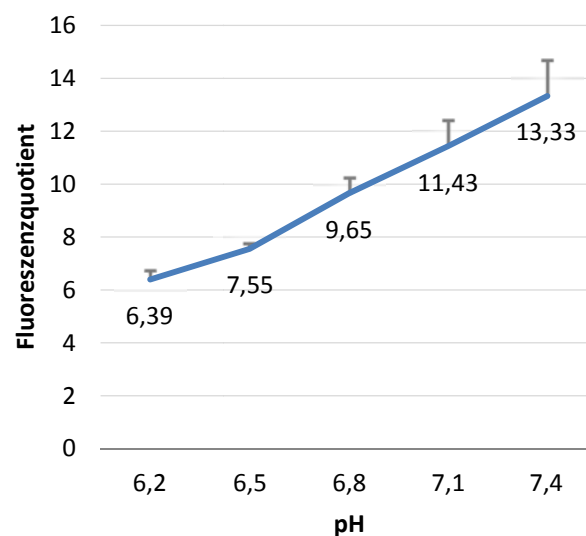


Abbildung 5: Kalibrierungskurve; pH-abhängige Fluoreszenz BCECF-markierter Plättchen-Mikropartikel

pH-Wert versus Fluoreszenz-Ratio, entsprechend dem Quotienten $Fu490/Fu440$ (Emission gemessen bei 516 nm, Exzitation bei 490 bzw. 440 nm). Der genaue Versuchsaufbau ist den Protokollen II.2.5.3 bis II.2.5.5 zu entnehmen. Mittelwerte \pm SD, $n=3-5$

III.2 MESSUNG DES PH-WERTES IN ISOLIERTEN MIKROPARTIKELN

Um den physiologischen pH-Wert der isolierten Mikropartikel zu bestimmen (pHi), wurden Thrombozyten-Mikropartikel isoliert und mit BCECF markiert. Anhand der in Abbildung 6 dargestellten Kalibrierungskurve wurde anschließend der pHi mittels des Fluoreszenzquotienten bestimmt. Der dabei ermittelte Fluoreszenz-Quotient von 11,87 (Abbildung 6) entspricht einem pHi von 7,2.

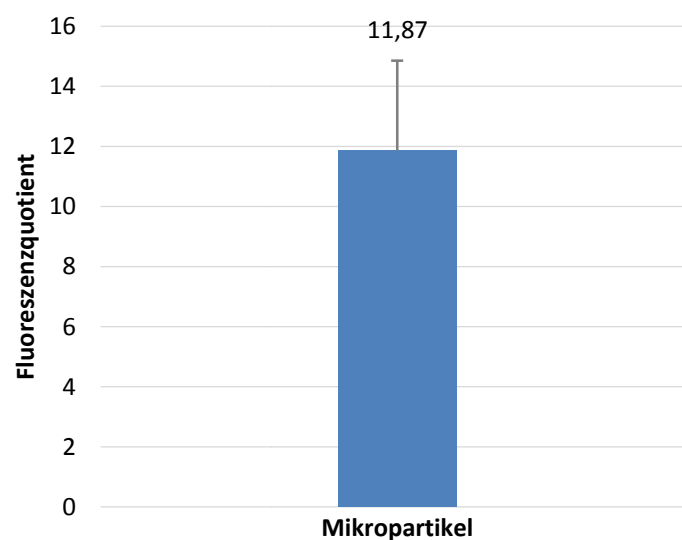


Abbildung 6: Fluoreszenz-Quotient isolierter BCECF-gefärbter Thrombozyten-Mikropartikel

Die Mikropartikel wurden laut Protokoll II.2.5.3 mit BCECF markiert, anschließend in 3 ml Resuspensionspuffer gelöst und in Quartzküvetten überführt. Der Fluoreszenzquotient der Probe wurde nach 60-sekündiger Erwärmung auf 37°C im Spektrofluorometer gemessen. Mittelwerte \pm SD, n=5

III.3 PH-MESSUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT BEI 37°C

Um die Interaktion der Mikropartikel mit Akzeptorzellen zu erfassen, wurden Thrombozyten-Mikropartikel für unterschiedliche Zeitintervalle mit THP-1 Zellen koinkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen, bevor die Ansätze in Quartzküvetten überführt wurden und der zell-assoziierte Fluoreszenzquotient im Spektrofluorometer gemessen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass der intravesikuläre pH nach 10 min signifikant abnimmt und nach 30 min weiter abfällt (Abbildung 7).

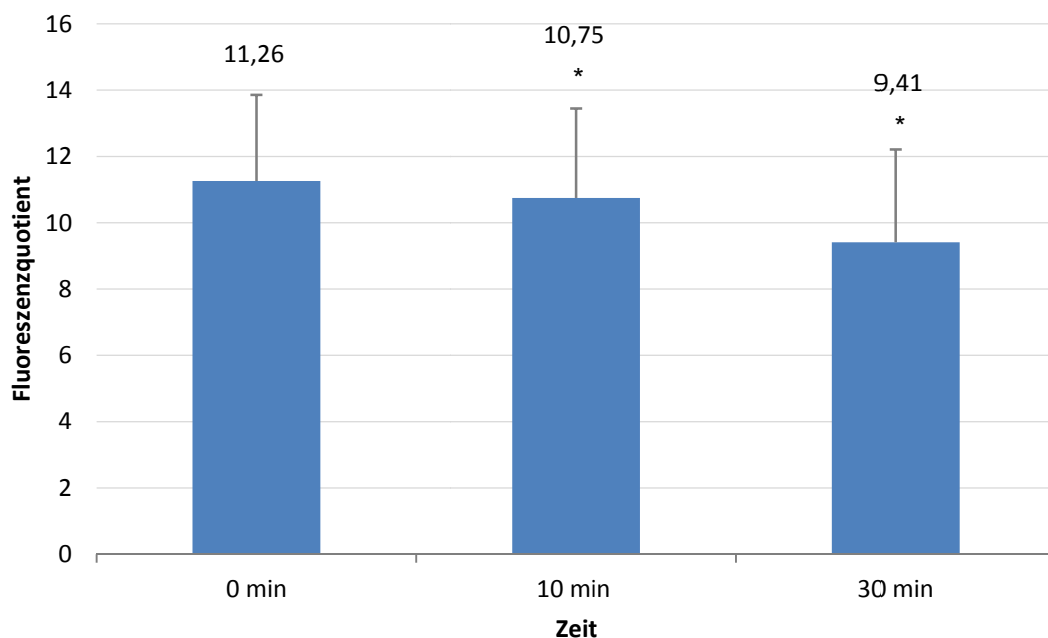


Abbildung 7: pHi in Thrombozyten-Mikropartikeln nach Inkubation mit THP-1 Zellen

Nach Koinkubation von 1×10^7 BCECF-markierten Thrombozyten-Mikropartikeln mit 1×10^5 THP-1-Zellen bei 37°C ist ein Abfall des pHi nachweisbar. Mittelwerte \pm SD, $n=3-5$, * $p<0,05$ vs. Kontrolle (0 min)

Unser Ergebnis lässt vermuten, dass der pH-Abfall durch die Endozytose von Mikropartikeln durch die THP-1 Zellen bedingt ist, da anzunehmen ist, dass der pH-Wert abnimmt, wenn die aufgenommenen Mikropartikel mit endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten fusionieren.

III.4 PH-MESSUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT BEI 4°C

Alle bekannten Wege der Endozytose sind bei niedrigen Temperaturen stark beeinträchtigt. Aus diesem Grund führten wir die Inkubation von Thrombozyten-Mikropartikeln mit THP-1 Zellen bei 4°C durch.

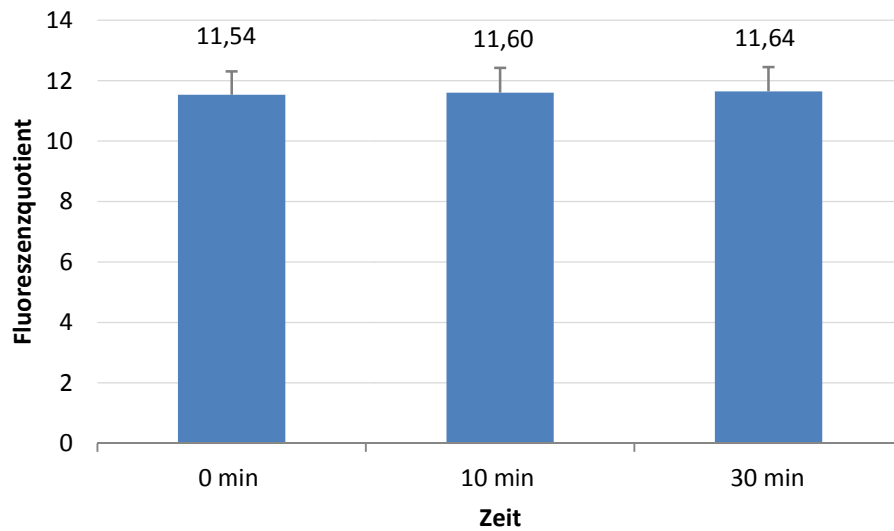


Abbildung 8: pHi in Thrombozyten-Mikropartikeln nach Inkubation mit THP-1 Zellen

Nach Koinkubation von 1×10^7 BCECF-markierten Thrombozyten-Mikropartikeln mit 1×10^5 THP-1-Zellen bei 4°C ist kein Abfall des pHi nachweisbar. Mittelwerte \pm SD, n=3

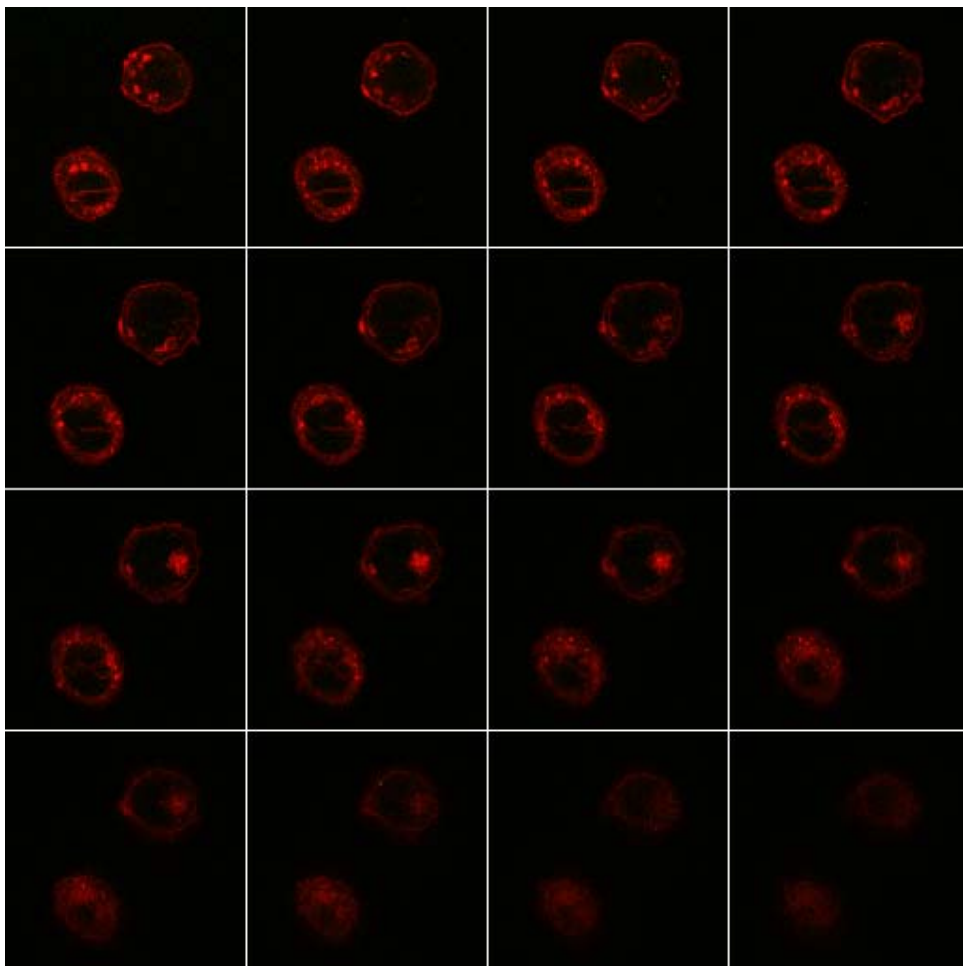
Es konnte nach 10- und 30-minütiger Koinkubation von THP-1 Zellen und Mikropartikeln keine Abnahme des pH-Wertes festgestellt werden (Abbildung 8).

Somit konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen regulierten Prozess handelt.

III.5 INTERNALISIERUNG VON MIKROPARTIKELN IN THP-1 ZELLEN

Um die Internalisierung der Mikropartikel zu visualisieren und festzustellen in welchen Kompartimenten der Akzeptorzellen sich die Mikropartikel anreichern, wurden zunächst Vybrant DiD gefärbte THP-1 Zellen mit DCF-markierten Mikropartikeln koinkubiert. Anschließend wurden die überschüssigen Mikropartikel gewaschen, die THP-1 Zellen mit Poplylysin auf Fluorodishes eingebettet und in der konfokalen Mikroskopie untersucht (Abbildung 9). Die Nullkontrolle entspricht der Koinkubation von Mikropartikeln mit THP-1 Zellen, gefolgt von einer sofortigen Zentrifugation mit anschließendem Waschen der THP-1 Zellen (Abbildung 9 a).

(a)



Ergebnisse

(b)

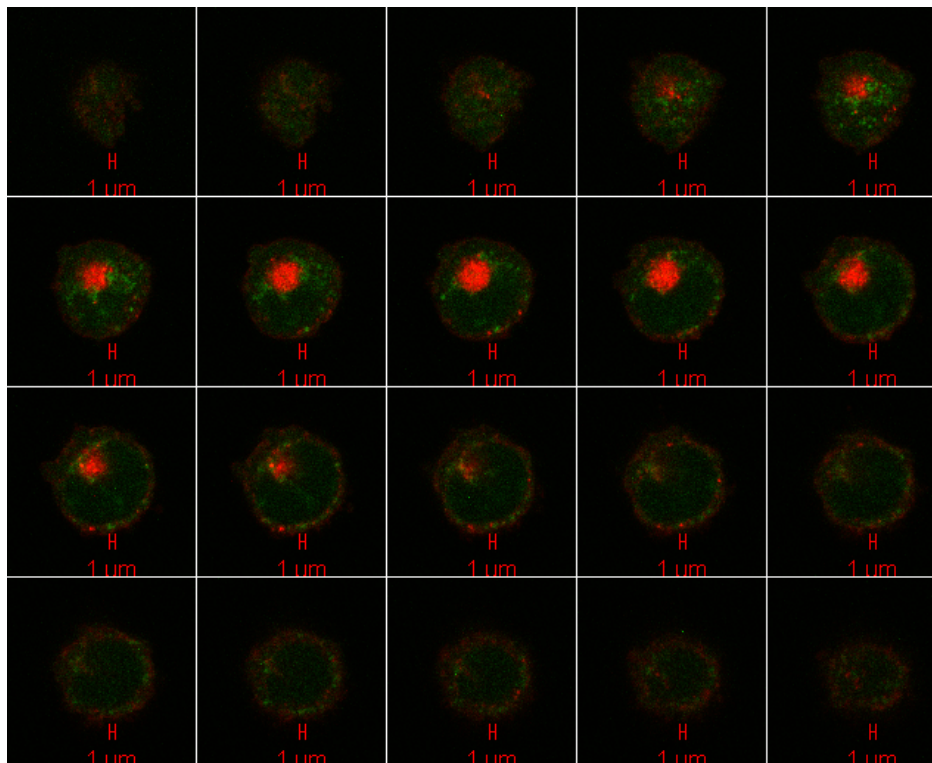


Abbildung 9: Vybrant DiD gefärbte THP-1 Zelle nach Aufnahme von DCF gefärbten Thrombozyten-Mikropartikeln

Z-Stapel durch eine THP-1 Zelle, Schichtdicke: 1 µm

Rot=Markierung der THP-1 Zellenmembran mit Vybrant DiD

Grün=Markierung der Mikropartikel mit DCF

a) Nullkontrolle

b) Nach 30 min Koinkubation bei 37°C

Die THP-1 Zellen, die sofort nach Koinkubation mit Mikropartikeln gewaschen wurden, zeigten im konfokalen Mikroskop ausschließlich eine Rotfärbung der Membranen, im Zellinneren war keine Grünfärbung sichtbar (Abbildung 9a)

Nach 30 min Koinkubation (Abbildung 9b) sind im Inneren der THP-1 Zellen teilweise grüne kreisrunde Strukturen zu erkennen, die $<1\ \mu\text{m}$ groß sind und eine Mikropartikel-spezifische Färbung aufweisen. Andererseits ist auch eine diffuse Grünfärbung im Inneren der Zelle sichtbar. Es ist daher anzunehmen, dass der wasserlösliche Farbstoff nach Mikropartikel-Internalisierung sich teilweise auf verschiedene intrazelluläre Kompartimente verteilt. Die Färbung ist in verschiedenen Schichten innerhalb der THP-1 Zelle zu sehen. Somit wird deutlich, dass die Mikropartikel in das Cytosol der Akzeptorzellen gelangen.

III.6 HEMMUNG DER MIKROPARTIKEL-INTERNALISIERUNG DURCH CYTOCHALASIN B

Cytochalasin B ist ein Pilz-Metabolit, der an Aktin bindet und so die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts verhindert. Durch diese Hemmung der Aktinpolymerisation werden verschiedene Endozytosewege beeinträchtigt (Merrifield 2004).

Nach Zugabe von Cytochalasin B zu isolierten THP-1 Zellen und Koinkubation mit Mikropartikeln wurde im Gegensatz zur Kontrolle kein vesikulärer pH_i-Abfall beobachtet (Abbildung 10).

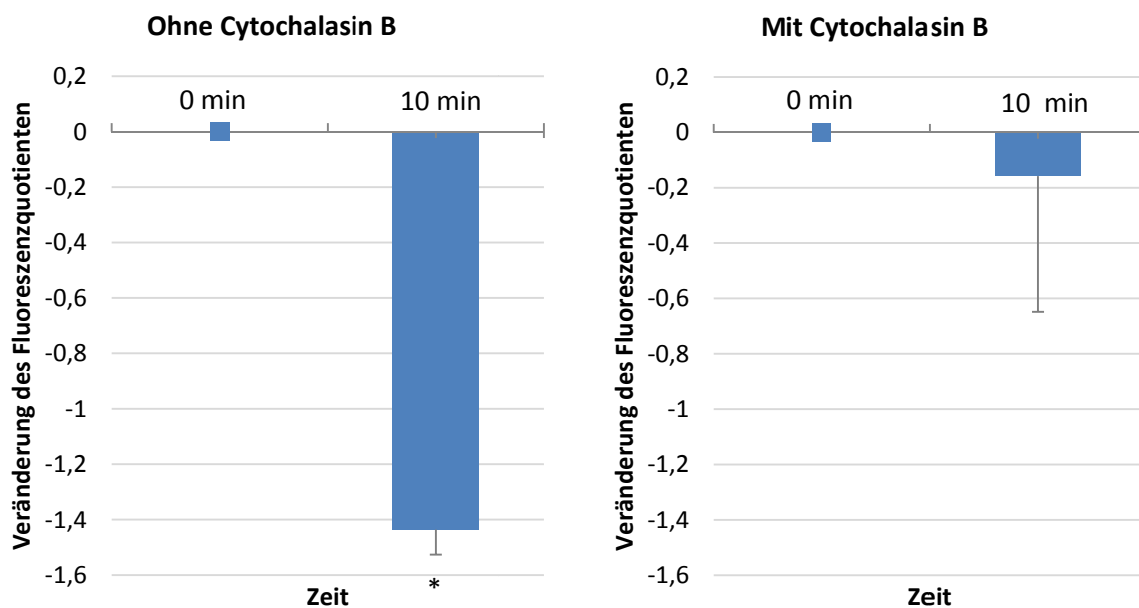


Abbildung 10: Messung von pH_i in Thrombozyten-Mikropartikeln nach Inkubation mit THP-1 Zellen und Zugabe von Cytochalasin B

Nach Zugabe von Cytochalasin B (10 µg/ml), war kein pH_i-Abfall der vesikulären Fluoreszenz festzustellen. Mittelwerte +/- SD, n=3 *p<0,05 vs. Kontrolle

Ergebnisse

Für den visuellen Nachweis des Einflusses von Cytochalasin B auf die Mikropartikel-Internalisierung wurden THP-1 Zellen und Thrombozyten-Mikropartikel für 30 min mit Cytochalasin B koinkubiert und daraufhin im konfokalen Mikroskop angesehen (Abbildung 11).

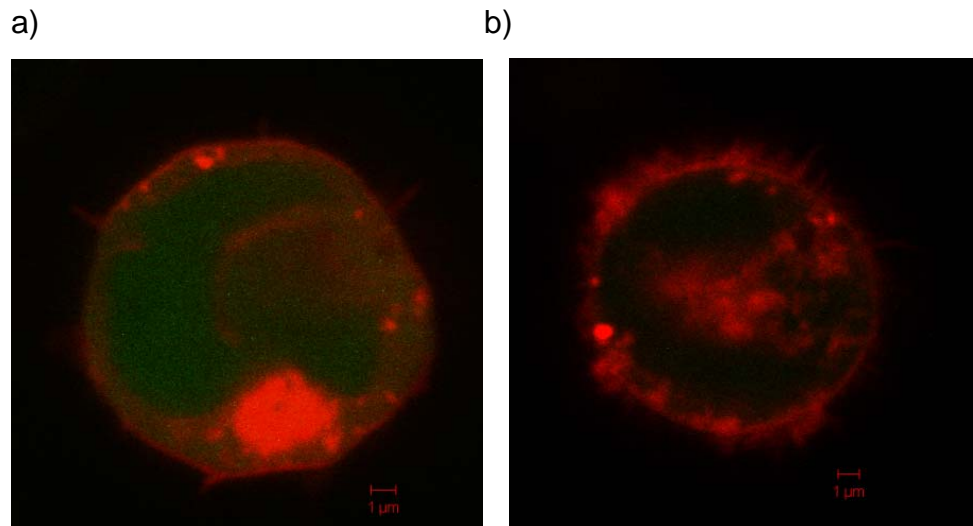


Abbildung 11: Koinkubation von Vybrant DiD gefärbten THP-1 Zellen und DCF gefärbten Plättchen-Mikropartikeln; Hemmung der Internalisierung nach Zugabe von Cytochalasin B.

THP-1 Zellen mit Thrombozyten-Mikropartikeln. Visualisierung mittels konfokaler Mikroskopie.

Rot=Markierung der THP-1 Zellmembran mit Vybrant DiD

Grün=Markierung der Mikropartikel mit DCF

a) Nach 30 min Koinkubation bei 37°C

b) Nach Zugabe von Cytochalasin B und 30 min Koinkubation bei 37°C

In der Kontrolle zeigte sich nach Koinkubation von Thrombozyten-Mikropartikeln mit THP-1 Zellen eine deutliche Grünfärbung der THP-1 Zellen.

Nach Vorinkubation der THP-1 Zellen mit Cytochalasin B war dagegen die Grünfärbung der Zelle reduziert. Somit ist von einer reduzierten Internalisierung der Mikropartikel in Gegenwart von Cytochalasin B auszugehen.

III.7 ZIRKULIERENDE MIKROPARTIKEL UND NEUTROPHILE GRANULOZYTEN

Um sicherzustellen, dass die zelluläre Internalisierung der Mikropartikel sich, abgesehen von THP-1 Zellen, auch auf andere Phagozyten übertragen lässt und nicht spezifisch für eine Zellart ist, wurden neutrophile Granulozyten und zirkulierende Mikropartikel von gesunden Spendern eingesetzt.

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurde die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit den zirkulierenden Mikropartikeln visualisiert. Hierzu wurden DCF gefärbte zirkulierende Mikropartikel mit Vybrant DiD markierten Neutrophilen koinkubiert. Derselbe Versuch wurde mit Zugabe von Cytochalasin B während der Koinkubation durchgeführt (Abbildung 12).

a)

b)

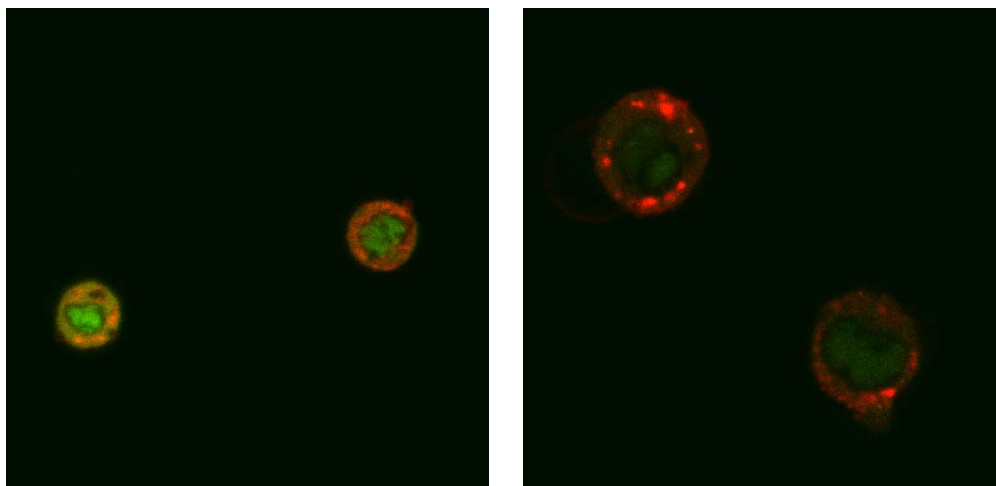


Abbildung 12: Internalisierung von zirkulierenden Mikropartikeln in neutrophile Granulozyten

Verminderte Internalisierung der zirkulierenden Mikropartikel durch neutrophile Granulozyten nach Zugabe von Cytochalasin B.

Rot=Markierung der Neutrophilen-Zellmembran mit Vybrant DiD

Grün=Markierung der Mikropartikel mit DCF

a) Neutrophile Granulozyten und zirkulierende Mikropartikel nach 30-minütiger Koinkubation bei 37°C

b) Neutrophile Granulozyten und zirkulierende Mikropartikel nach 30-minütiger Koinkubation mit Cytochalasin B bei 37°C.

Nach Koinkubation von neutrophilen Granulozyten mit zirkulierenden Mikropartikeln zeigte sich eine deutliche Grünfärbung im Inneren der neutrophilen Granulozyten und somit eine Internalisierung der Mikropartikel. Nach Vorinkubation mit Cytochalasin B, war die Grünfärbung der Neutrophilen geringer ausgeprägt.

III.8 AUFNAHME TF-CFP POSITIVER MIKROPARTIKEL IN THP-1 ZELLEN

In einem nächsten Schritt wurden die Membrankomponenten der Mikropartikel anstelle des wasserlöslichen inneren Kompartiments markiert.

Hierzu transfizierten wir CHO-Zellen mit einem Plasmid, in dem das Gen für das Membranprotein TF mit CFP markiert worden war (Abbildung 13). Hieraus generierten wir TF-CFP positive Mikropartikel (Abbildung 14).

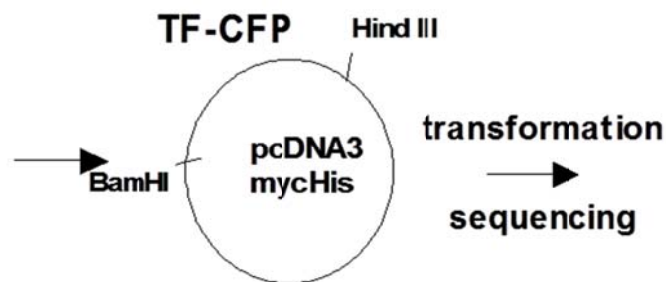


Abbildung 13: TF-CFP; Herstellung der pcDNA

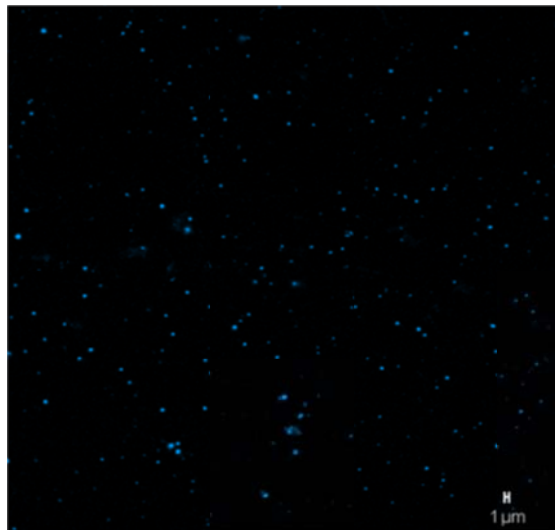


Abbildung 14: TF-CFP positive Mikropartikel aus TF-CFP-transfizierten CHO-Zellen

Transfektion von CHO-Zellen mit TF-CFP wie in II.2.3.3 beschrieben. Anschließende Generierung von Mikropartikeln aus den transfizierten CHO-Zellen. Darstellung der TF-CFP positiven Mikropartikel mittels konfokaler Mikroskopie.

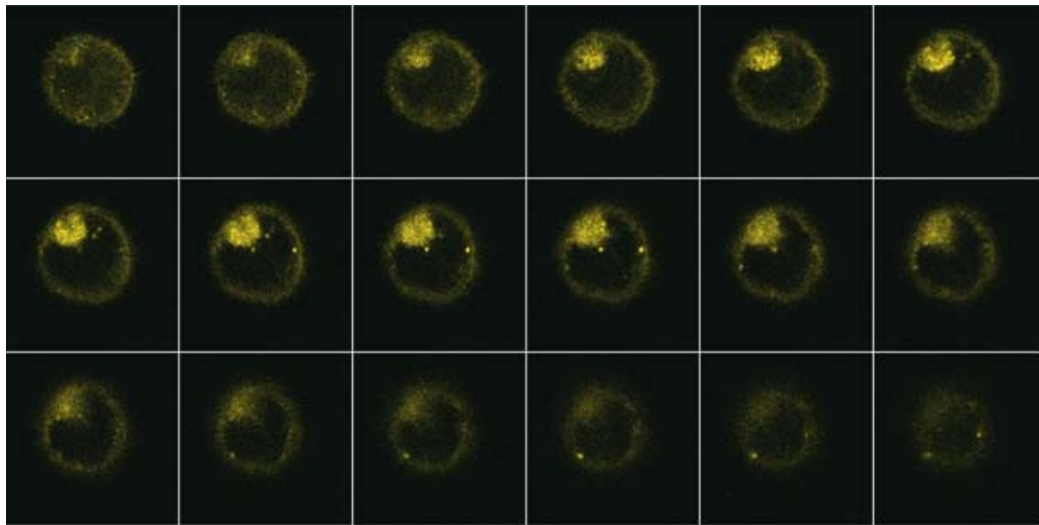
Um die Interaktion der TF-CFP markierten Mikropartikeln mit THP-1 Zellen zu analysieren, wurden Vybrant DiD gefärbte THP-1 Zellen mit TF-CFP positiven Mikropartikeln koinkubiert. Anschließend wurden die überschüssigen Mikropartikel weggewa-

Ergebnisse

schen, die THP-1 Zellen mit Polylysine auf Fluorodishes eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Auf der Ebene der Zellmembran und im Inneren der THP-1 Zellen ist eine durch TF-CFP induzierte Blaufärbung zu sehen (Abbildung 15). Dies zeigt, dass eine Internalisierung der Mikropartikel in THP-1 Zellen auch nachgewiesen werden kann, wenn die Mikropartikel in ihrem Membranteil markiert wurden.

(a)



(b)

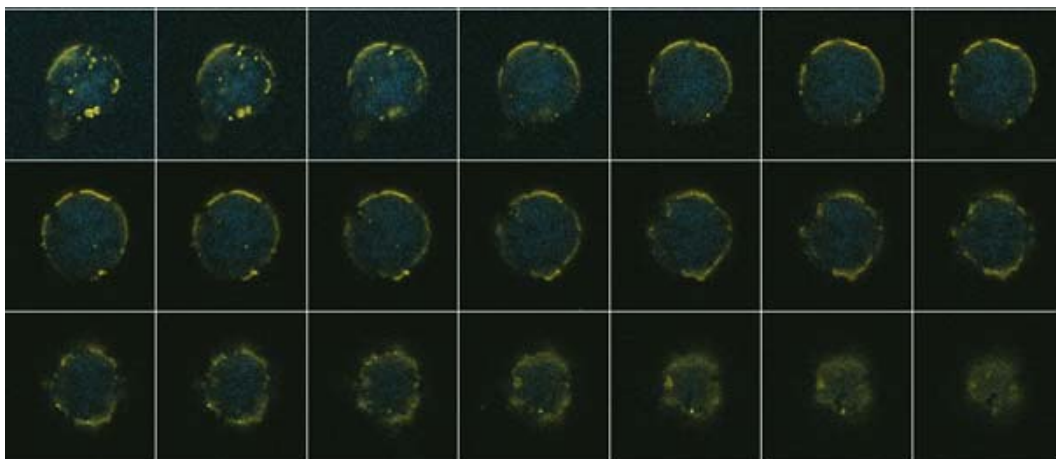


Abbildung 15: THP-1 Zellen und TF-CFP positive Mikropartikel nach 30 min Koinkubation, Z-Stapel, Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke: 0,6µm.

Assoziation der Mikropartikel mit der Zellmembran und mit dem Zytosol der THP-1 Zellen

Gelb=Markierung der THP-1-Zellmembran mit Vybrant DiD

Blau=TF-CFP positive Mikropartikel

a) Nullkontrolle

b) Nach 30 min Koinkubation bei 37°C

III.9 DYNAMIN-K44A

In weiteren Experimenten wurde durch Transfektion der Akzeptorzellen mit der Dynamin-Mutante pcDNA3-Dynamamin-K44A die Clathrin-abhängige (van der Blik, Redelmeier et al. 1993) und die Caveolae-induzierte Endozytose gehemmt (Dessy, Kelly et al. 2000). Hierzu wurden anstelle der THP-1 Zellen U-937 Zellen eingesetzt, die besser transfizierbar sind.

Auch U-937 Zellen nahmen schnell thrombozytäre Mikropartikel auf (Abbildung 16a). Hingegen zeigte sich in den mit Dynamamin K44A-transfizierten U-937 Zellen keine Aufnahme der Thrombozyten-Mikropartikel (Abbildung 16b).

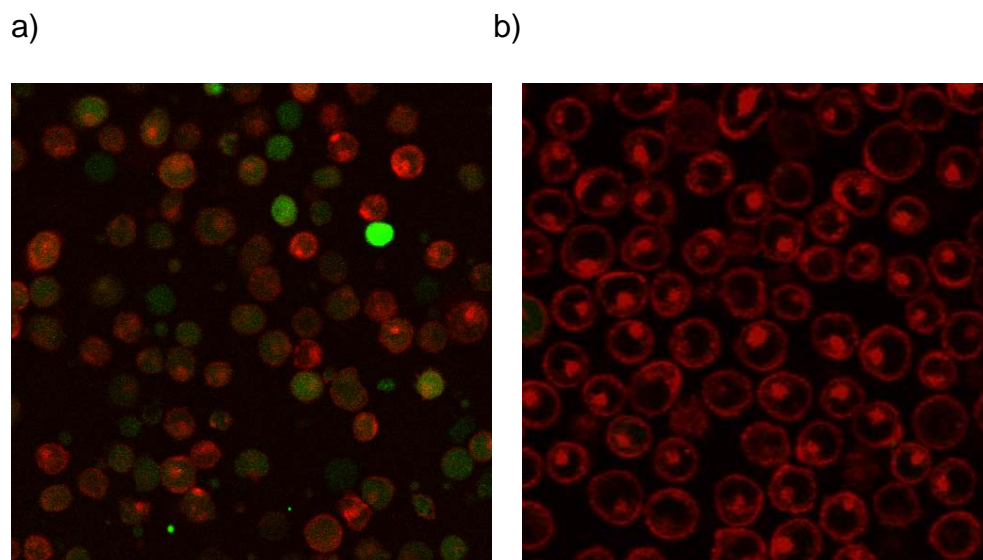


Abbildung 16: Internalisierung von Thrombozyten-Mikropartikeln in U-937 Zellen

a) Kontrolle mit wt U-937 Zellen, 30 min Koinkubation bei 37°C

b) Dynamamin K44A-transfizierte U-937 Zellen, 30 min Koinkubation bei 37°C

Rot=Markierung der U-937 Zellmembran mit Vybrant DiD

Grün=Markierung der Mikropartikel mit DCF

III.10 BEEINFLUSSUNG DER INTERNALISIERUNG DURCH ERKENNUNGSMARKER FÜR DIE PHAGOZYTOSE APOPTOTISCHER ZELLEN

III.10.1 Annexin V

Annexin V ist ein 35 kD Protein mit der Eigenschaft, Ca^{2+} -abhängig an negative Phospholipide zu binden, und hat dementsprechend eine sehr hohe Affinität zu PS (Raynal and Pollard 1994). Es ist bekannt, dass die Bindung von Annexin V an PS auf der Oberfläche von apoptotischen Zellkörpern deren Phagozytose hemmen kann (Callahan, Williamson et al. 2000), (Krahling, Callahan et al. 1999). Wir vermuteten, dass PS auf der Oberfläche der Mikropartikel als Erkennungssignal für die Internalisierung durch Akzeptorzellen darstellen könnte.

Nach Zugabe von Annexin V und CaCl_2 war die anhand des pH-Abfalls gemessene Internalisierung thrombozytärer Mikropartikel in THP-1 Zellen inhibiert (Abbildung 17).

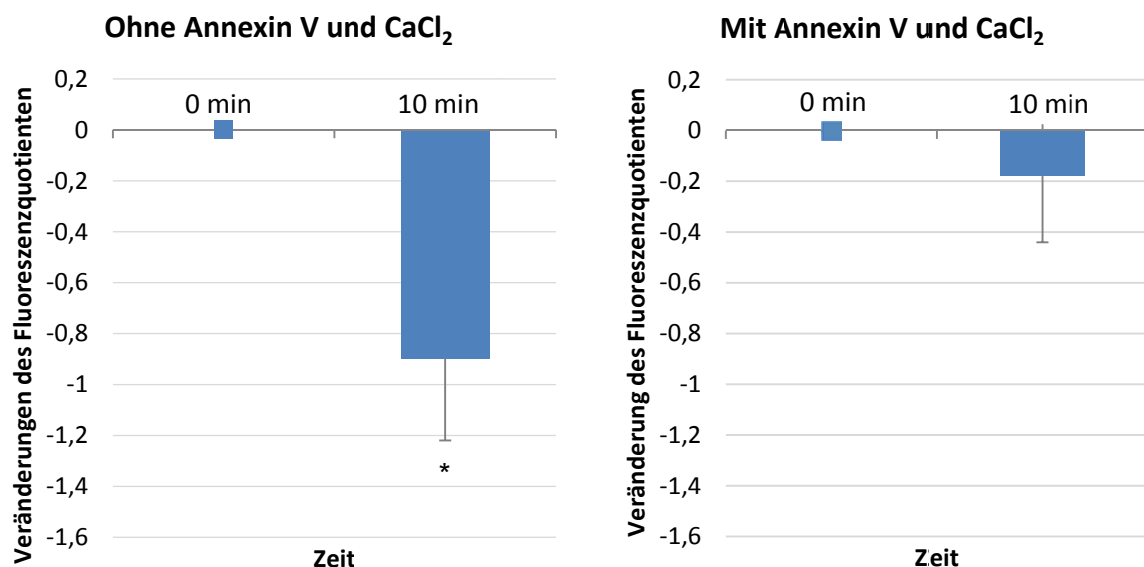


Abbildung 17: Koinkubation von THP-1 Zellen und Thrombozyten-Mikropartikeln; Hemmung der zellulären Aufnahme durch Annexin V

Die Zugabe von Annexin V und CaCl_2 verhindert den pH-Abfall. Mikropartikel wurden mit Annexin V (1 μM) und CaCl_2 (1,5 mM) 10 min lang bei 37°C vorinkubiert. Nach Hinzufügen der THP-1 Zellen erfolgte die Koinkubation für weitere 10 min, bevor die Fluoreszenzintensität im Spektrofluorophotometer gemessen wurde. Mittelwerte \pm SD, n=3 *p<0,05 vs. Kontrolle

III.10.2 Duramycin

Neben PS wird auf der Oberfläche von Mikropartikeln auch PE präsentiert. Das polypeptidische Antibiotikum Duramycin stellt einen spezifischen Marker für PE dar (Navarro, Chabot et al. 1985).

Wir vermuteten, dass PE auf der Oberfläche der Mikropartikel die Erkennung für die Internalisierung durch Akzeptorzellen beeinträchtigen könnte und führten daher eine Vorinkubation der Mikropartikel mit Duramycin durch.

Nach Zugabe von Duramycin war die anhand des pH-Abfalls gemessene Internalisierung thrombozytärer Mikropartikel in THP-1 Zellen inhibiert (Abbildung 18).

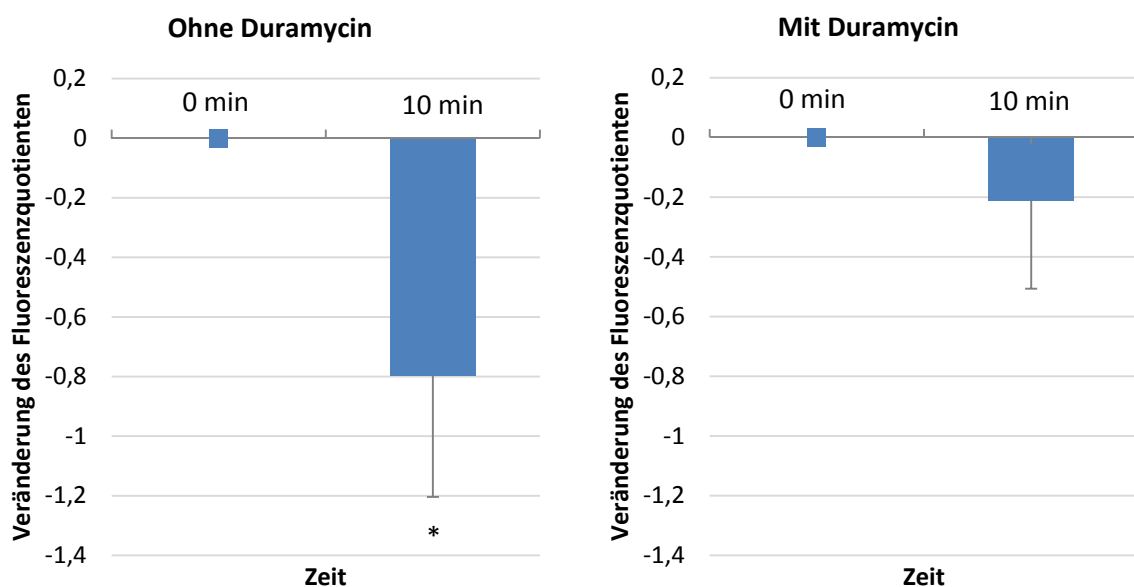


Abbildung 18: Koinkubation von THP-1 Zellen und Thrombozyten-Mikropartikeln; Hemmung der zellulären Aufnahme durch Duramycin

Die Zugabe von Duramycin verhindert den pH-Abfall. Mikropartikel wurden mit Duramycin 10 min lang bei 37°C vorinkubiert. Nach Hinzufügen der THP-1 Zellen erfolgte die Koinkubation für weitere 10 min, bevor die Fluoreszenzintensität im Spectrofluorophotometer gemessen wurde. Mittelwerte \pm SD, $n=3$ * $p<0,05$ vs. Kontrolle.

III.10.3 Anti-Calreticulin-AK

Das extrazelluläre Brückenmolekül Calreticulin tritt während der Apoptose vermehrt und neu verteilt auf Membranoberflächen von Zellen auf. Durch die Interaktion von Calreticulin mit der Oberfläche von apoptotischen Zellen kann es deren Glykosilierungsmuster verändern und dadurch die Erkennung für Phagozyten erleichtern. Somit könnte Calreticulin bei der Entfernung apoptotischer Zellen als „eat-me-signal“ wirken (Gardai, McPhillips et al. 2005).

Im Photometer-Versuch war der Abfall der Fluoreszenzintensität durch die Zugabe von Anti-Calreticulin-AK geringer als in der Kontrolle (Abbildung 19).

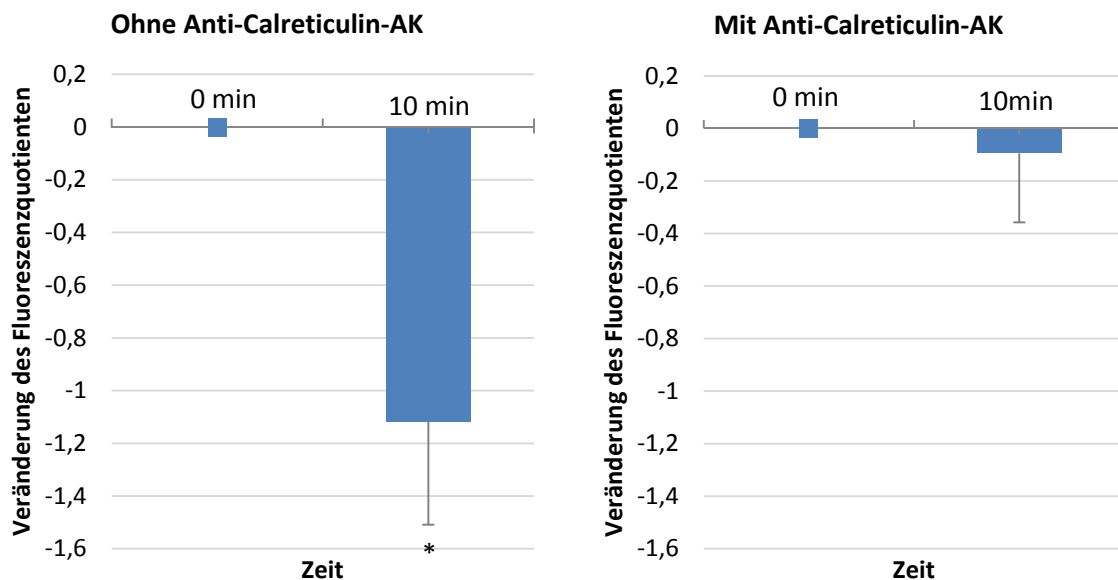


Abbildung 19: Koinkubation von THP-1 Zellen und Plättchen-Mikropartikeln; Hemmung der Endozytose durch Anti-Calreticulin-AK

Die Zugabe von Anti-Calreticulin-AK führte zu einer Aufhebung des pHi-Abfalls, welcher nach Inkubation der Mikropartikel mit THP-1 Zellen zu sehen war. Mittelwerte \pm SD, $n=3$ * $p<0,05$ vs. Kontrolle

Um die Bedeutung von PS und Calreticulin bei der Aufnahme der Mikropartikel in THP-1 Zellen zu visualisieren, wurden DCF-markierte Mikropartikel mit Annexin V und CaCl_2 bzw. Anti-Calreticulin-AK vorinkubiert, bevor Vybrant DiD gefärbte THP-1 Zellen dazu gegeben wurden und das komplette Mikropartikel-THP-1 Zellen-Gemisch bei 37°C 30 min lang koinkubiert wurde. Anschließend wurden die überschüssigen Mikropartikel gewaschen, die THP-1 Zellen mit Polylysin auf Fluorodishes eingebettet und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht (Abbildung 20).

Ergebnisse

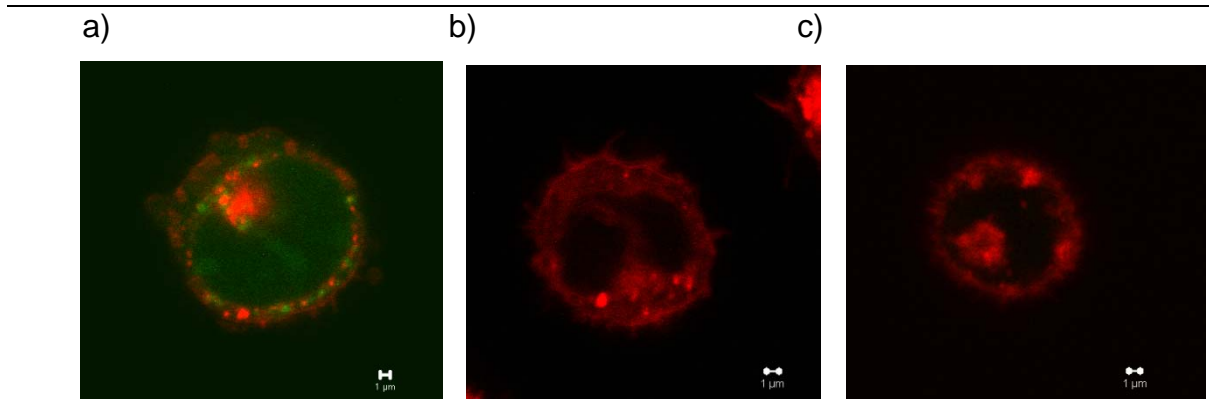


Abbildung 20: Koinkubation von Vybrant DiD gefärbten THP-1 Zellen und DCF gefärbten Thrombozyten-Mikropartikeln; Hemmung der Internalisierung durch Zugabe von Anti-Calreticulin-AK oder Annexin V

THP-1 Zellen mit Thrombozyten-Mikropartikeln. Darstellung der Proben mittels konfokaler LSM. Die THP-1 Zellen sind adhärent auf Polylysin-gecoateten Fluorodishes

Rot=Markierung der THP-1 Zellmembran mit Vybrant DiD

Grün=Markierung der Mikropartikel mit DCF

a) Kontrolle; 30 min Koinkubation bei 37°C

b) Zugabe von Anti-Calreticulin-AK; 30 min Koinkubation bei 37°C

c) Zugabe von Annexin V und CaCl_2 ; 30 min Koinkubation bei 37°C

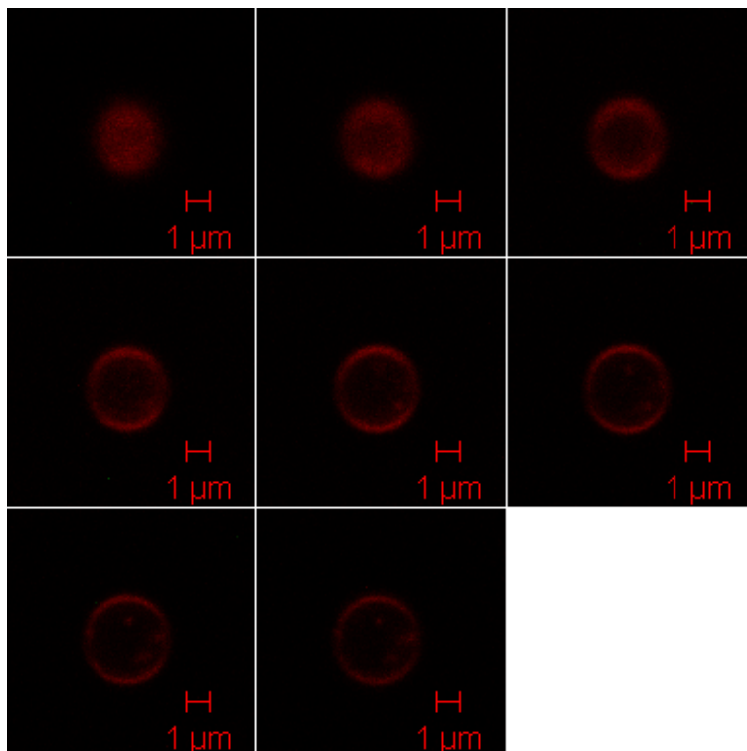
In der Kontrolle war der grüne Farbstoff der DCF-gefärbten Mikropartikel im Inneren der THP-1 Zellen nach 30 min Koinkubation gut sichtbar. Dagegen zeigte sich in Anwesenheit von Annexin V und des Anti-Calreticulin-Antikörpers eine deutlich schwächere Grünfärbung im Zellinneren. Dies deutet auf eine verminderte Aufnahme von Mikropartikeln in Anwesenheit von Annexin V und Anti-Calreticulin-AK hin.

III.11 INTERNALISIERUNG VON MIKROPARTIKELN DURCH THROMBOZYTEN

Thrombozyten besitzen eine geringe Endozytose-Kapazität. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurde die Interaktion von Thrombozyten mit THP-1 Mikropartikeln visualisiert. Hierzu wurden DCF gefärbte THP-1-Mikropartikel mit ADP-aktivierten und Vybrant DiD markierten Thrombozyten koinkubiert. Der gleiche Versuch wurde mit durch Cytochalasin B vorinkubierten Thrombozyten durchgeführt (Abbildung 21c).

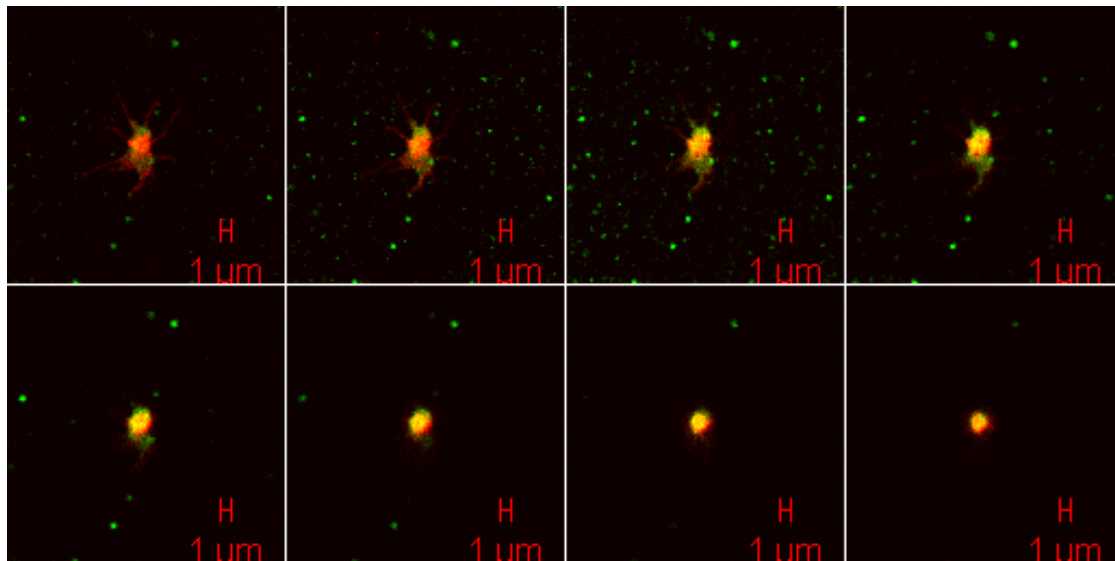
Die Kontrolle entspricht der Koinkubation von ADP-aktivierten Thrombozyten mit THP-1 Zellen, gefolgt von einer Zentrifugation mit anschließendem Waschen der Thrombozyten (Abbildung 21a).

a)



Ergebnisse

b)



c)

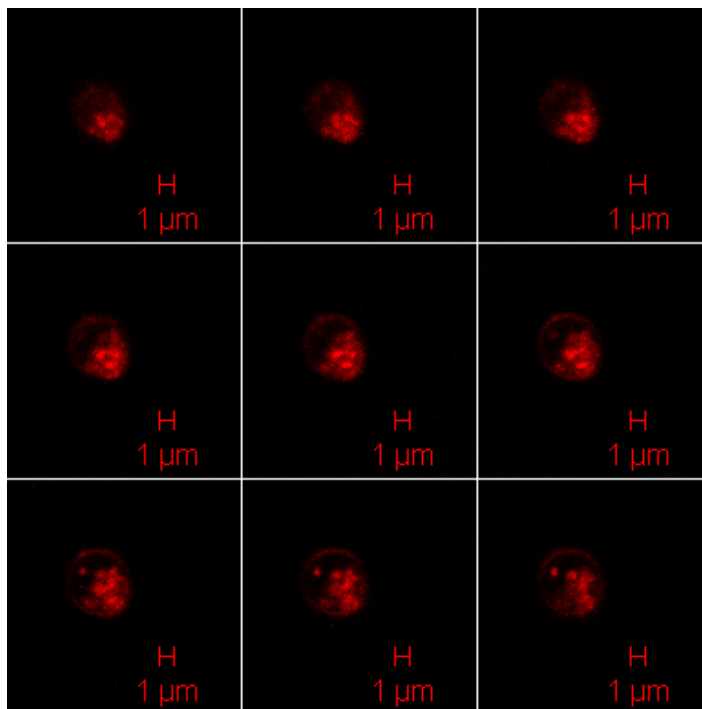


Abbildung 21: Koinkubation von Thrombozyten und THP-1 Mikropartikeln; Hemmung der Internalisierung durch Zugabe von Cytochalasin B

Koinkubation von Thrombozyten mit THP-1-Mikropartikeln bei 37° C. Darstellung der Proben mittels konfokaler Mikroskopie. Z-Stapel, Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke: < 1 µm. Die Thrombozyten sind adhärent auf Fibrinogen gecoateten Fluorodishes

Rot=Markierung der Thrombozyten-Zellmembran mit Vybrant DiD

Grün=Markierung der Mikropartikel mit DCF

a) ADP-aktivierter Thrombozyt, Waschung direkt nach Zugabe der Mikropartikel

b) ADP-aktivierte Thrombozyten nach 30-minütiger Koinkubation mit THP-1 Mikropartikeln

c) ADP-aktivierte Thrombozyten mit Cytochalasin B und 30-minütiger Koinkubation mit THP-1 Mikropartikeln

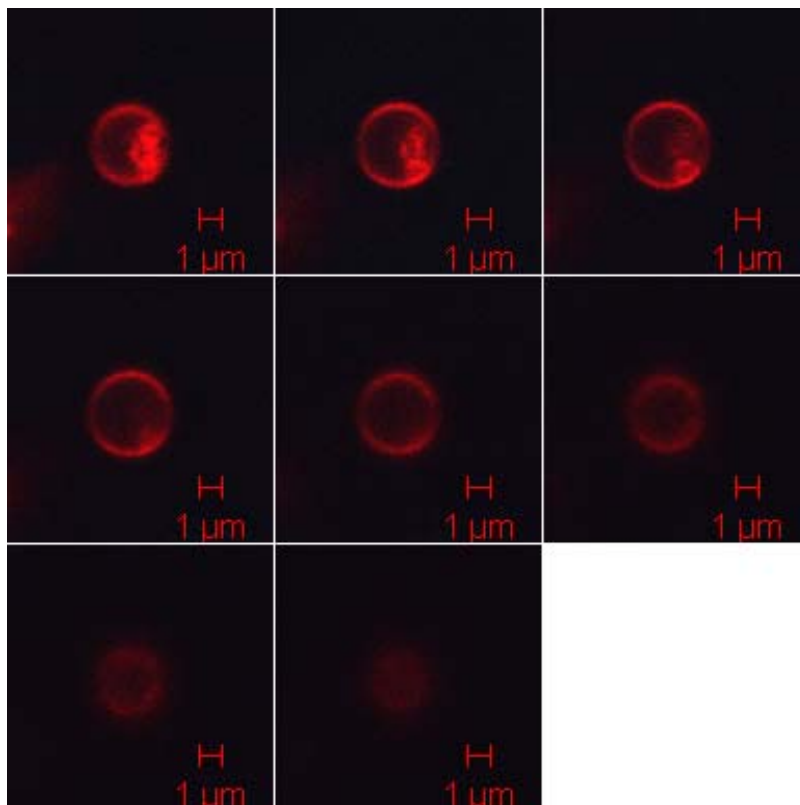
Ergebnisse

Direkt nach Koinkubation von ADP-aktivierten Thrombozyten mit den Mikropartikeln waren die Plättchen zum größten Teil ruhend und rund. Man sieht, dass bei den Thrombozyten nach 30-minütiger Inkubation die bekannten Phänomene der Filopodienausbreitung und Spreading auftraten, es zeigte sich ebenfalls eine diffuse Grünfärbung im Inneren der Thrombozyten.

Bei den mit Cytochalasin B präinkubierten und anschließend stimulierten Thrombozyten blieben diese in ihrer ruhenden Form, eine Grünfärbung in ihrem Inneren konnte nicht beobachtet werden.

Um sicherzugehen, dass die Mikropartikel tatsächlich von Thrombozyten internalisiert wurden und nicht der wasserlösliche Farbstoff ins Innere der Zelle dissoziiert war, wiederholten wir den Versuch mit einer membranständigen Färbung der Mikropartikel. Dafür transfizierten wir CHO-Zellen mit TF-CFP und generierten anschließend Mikropartikel aus den TF-CFP positiven CHO-Zellen. Anschließend wurden Thrombozyten und TF-CFP positive Mikropartikel koinkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 22).

a)



b)

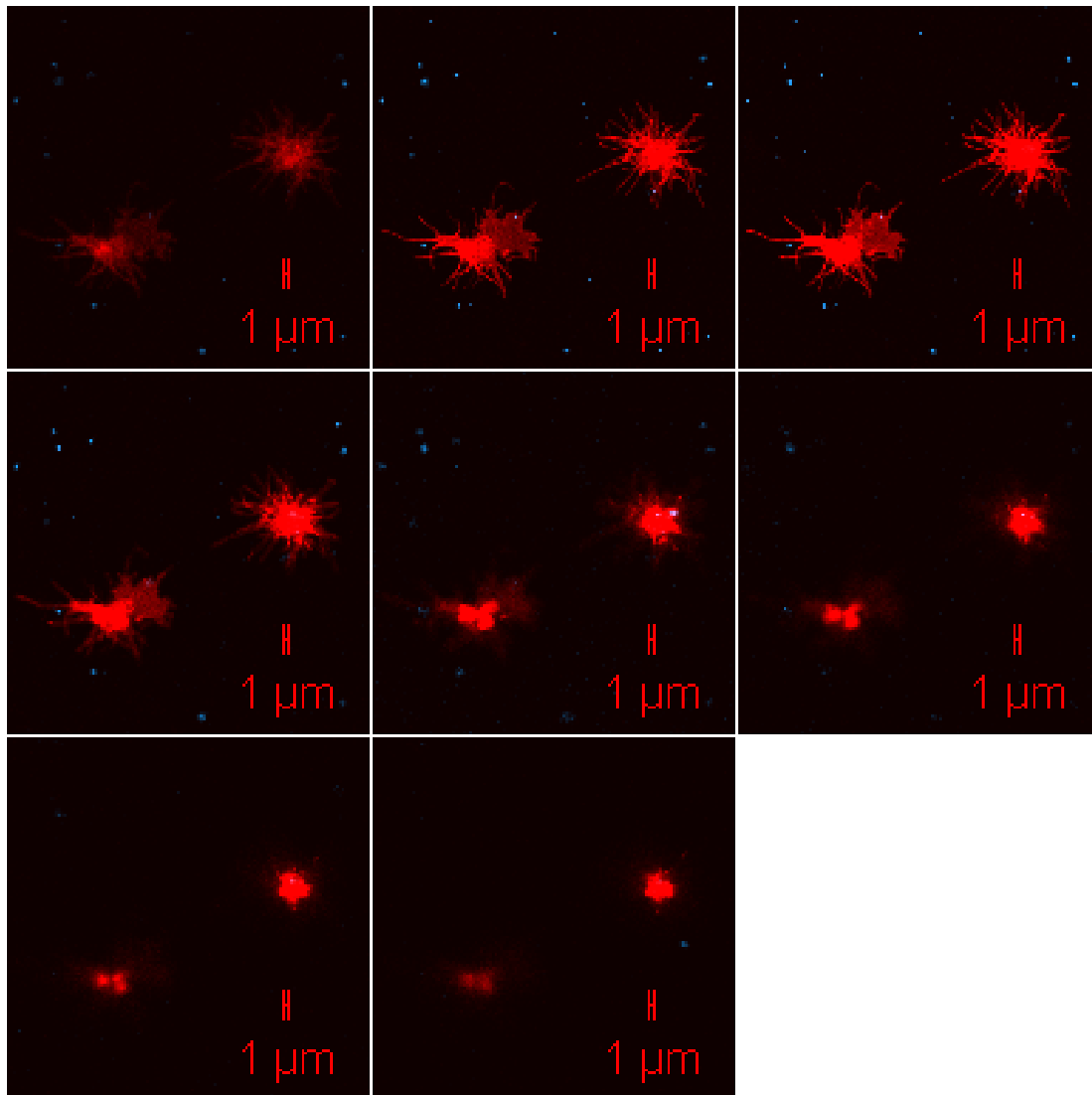


Abbildung 22: Interaktion von Thrombozyten mit TF-CFP positiven Mikropartikeln

Thrombozyten mit TF-CFP positiven-Mikropartikeln aus CHO-Zellen. Darstellung der Proben mittels konfokaler LSM. Die Thrombozyten sind adhären auf Fibrinogen gecoateten Fluorodishes, Schichtdicke 0,4 µm

Rot=Markierung der Thrombozyten-Zellmembran mit Vybrant DiD

Blau=TF-CFP positive Mikropartikel

a) Ruhender Thrombozyt, der nach Koinkubation mit TF-CFP positiven Mikropartikeln gewaschen wurde

b) ADP-aktivierte Thrombozyten nach 30 min Koinkubation mit TF-CFP positiven Mikropartikeln

In der Nullkontrolle, bei der die Thrombozyten direkt nach der Zugabe der Mikropartikeln gewaschen wurden, sind keine Mikropartikel im Zellinneren sichtbar. Nach 30-minütiger Koinkubation von Thrombozyten mit TF-CFP positiven CHO Zellen sind hingegen die TF-CFP positiven Mikropartikel im Inneren der Thrombozyten zu sehen.

Ergebnisse

Allerdings lässt sich aufgrund der flachen Struktur der aktivierten Thrombozyten selbst in der Laserscan-Mikroskopie keine eindeutige Aussage über die Lokalisation der Mikropartikel in Bezug auf die Thrombozyten treffen. Bei einer Auflösung von 0,4 μm ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit von einer Internalisierung der Mikropartikel auszugehen.

IV. DISKUSSION

Mikropartikel sind kleine (0,1-1 μm) lipidreiche Vesikel, die durch diverse Mechanismen wie mechanischen Stress (Diehl, Nagy et al. 2008), Apoptose (Barry, Pratico et al. 1997), (Mallat, Hugel et al. 1999) und Zellaktivierung (Beaudoin and Grondin 1991) von Plasmamembranen vielfältiger Zellen abgegeben werden können. Sie haben vermutlich viele (patho)-physiologische Funktionen z.B. im Bereich der Hämostase und bei der Entstehung und Progression von Erkrankungen wie Atherosklerose und Malignomen (Barry and FitzGerald 1999), (Diamant, Tushuizen et al. 2004), (Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010).

Die Mechanismen, die die Internalisierung der Mikropartikel durch andere Zellen regulieren sind bis heute weitestgehend unbekannt. Veränderungen der Mikropartikel-Clearance könnten für erhöhte Mikropartikel-Gesamtkonzentrationen im Plasma verantwortlich sein, die unter anderem mit einer erhöhten Thromboseneigung korrelieren (Martinez, Tesse et al. 2005), (Faure, Dou et al. 2006). Auch scheinen maligne Erkrankungen mit einer erhöhten Zahl an Mikropartikeln im zirkulierenden Blut einherzugehen (Toth, Nieuwland et al. 2008; Muralidharan-Chari, Clancy et al. 2010).

Um ein verbessertes Verständnis der Physiologie der Mikropartikel zu gewinnen, sind Bestimmungen der Baseline-Levels in gesunden Populationen, Fluktuationen dieser Level über die Zeit und die Lebensdauer von Mikropartikeln erforderlich. *In vivo*-Versuche, wobei Plättchen-Mikropartikel in Hasenblut injiziert wurden, zeigten keinen Anstieg der Mikropartikel-Zahl, wohingegen die Zugabe dieser Mikropartikel in Hasenblut, unter Bedingungen unter denen ihre Clearance gehemmt war, zu einem signifikanten Anstieg des Mikropartikel-Levels führte (Rand, Wang et al. 2006). Die Möglichkeit, dass endogene Mikropartikel rasch von der Zirkulation entfernt werden, setzt auch voraus, dass sie kontinuierlich gebildet werden, um ein Basislevel aufrechtzuerhalten.

Verschiedene potenzielle Mechanismen der Clearance werden derzeit diskutiert.

Einerseits wurde eine ungerichtete Elimination von Mikropartikeln beschrieben. So könnten Mikropartikel über die Aktivität von zirkulierenden Phospholipasen wie der sekretorischen Phospholipase A2 zerstört werden (Fourcade, Simon et al. 1995)

Da Mikropartikel Membranproteine von einer Zelle zur anderen transferieren können, (Mack, Kleinschmidt et al. 2000), (Kawamoto, Ohga et al. 2012), ist anzunehmen, dass es sich um einen gerichteten Prozess handelt.

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, den Mechanismus der Internalisierung von Mikropartikeln durch Akzeptorzellen zu analysieren und somit ein Verständnis über mögliche Wege der Mikropartikel-Clearance auf zellulärer Ebene zu gewinnen.

IV.1 ENDOZYTOTOSE DER MIKROPARTIKEL

Die Endozytose ist ein fundamentaler Prozess der Internalisierung von extrazellulärem Material in eukaryontischen Zellen, der von der Nahrungsaufnahme bis zur Signalvermittlung reicht. Hierbei wird extrazelluläres Material von der Zellmembran umhüllt und in Vesikel, sogenannte Endosomen verpackt. Intrazellulär verschmelzen diese Einschlusskörperchen unter Umständen mit Lysosomen, die saure hydrolytische Enzyme beinhalten und das aufgenommene Material zersetzen können.

Wenn man annimmt, dass Mikropartikel von den Akzeptorzellen durch Endozytose aufgenommen werden, gelangen diese über die Zeit in Endosomen, Caveosomen oder Lysosomen. In allen diesen Kompartimenten liegt ein geringerer pH-Wert vor als dies im Inneren des Zytosols der Fall ist.

Daher entwickelten wir eine Methode, mittels derer der intravesikuläre pH der Mikropartikel gemessen werden kann. Die Thrombozyten-Mikropartikel wurden mit dem pH-sensitiven Farbstoff BCECF markiert. Dieser Farbstoff kann durch die Plasmamembran diffundieren und so ins Zytoplasma der Elternzelle gelangen, aus der die markierten Mikropartikel freigesetzt werden (Draper, Martell et al. 1997), (Hirohashi, Terasaki et al. 1997).

Im Fluoreszenz-Photometer wurde der Farbstoff bei 2 unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. Bei der Anregung von 440 nm ist die bei 516 nm freigesetzte Emissionsintensität pH-unabhängig. Bei einer Exzitation von 490 nm hingegen ist sie pH-abhängig. BCECF wurde kurz hintereinander mit den Wellenlängen 440 nm und 490 nm angeregt, so dass der Quotient der beiden Emissionsintensitäten proportional zum intramikropartikulären pH ist.

Da die freigesetzten Mikropartikel intravesikuläre zytoplasmatische Komponenten enthalten, ist anzunehmen, dass der intravesikuläre pH dem intrazellulären pH der Ursprungszelle gleicht. In der Tat fanden wir ein dem Zytoplasma entsprechender pH der Mikropartikel von 7,2.

Der pH_i der BCECF-markierten Mikropartikel fiel nach Koinkubation mit monozytären THP-1 Zellen bei 37°C schon nach kurzer Zeit (10 min) ab. Dies spricht für eine En-

Diskussion

dozytose mit anschließender Verschmelzung von Mikropartikeln mit sauren endosomal Kompartimenten. Dagegen war bei 4°C kein Abfall des pH's festzustellen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Mikropartikel durch einen aktiven Prozess wie Endozytose aufgenommen werden und dieser Vorgang relativ schnell abläuft.

So wurde beobachtet, dass integrale Membranproteine wie beispielsweise Major histocompatibility Complex (MHC) Klasse II und CD3 von Mikropartikeln auf polymorphkernige Neutrophile innerhalb kurzer Zeit sowohl bei 37° C als auch bei 4° C transferiert wurde. Daraus wurde gefolgert, dass es sich somit um einen passiven Prozess handeln müsse (Whale, Beskorwayne et al. 2006). Möglicherweise sind die von uns untersuchten Interaktionen der Mikropartikel mit monozytären Zellen anders als die Interaktionen der Mikropartikel mit neutrophilen Granulozyten.

Um die Aufnahme von Mikropartikeln in Akzeptorzellen qualitativ nachzuweisen, visualisierten wir die Interaktion von Mikropartikeln und THP-1 Zellen mittels Laserscanmikroskopie (LSM). Für die Darstellung wurden Plasmamembranen isolierter THP-1 Zellen mit Vybrant DiD gelabelt. Danach wurden die Vybrant DiD-gefärbten THP-1 Zellen mit DCF-gelabelten Mikropartikeln inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min ergab sich eine intrazelluläre Grünfärbung der THP-1 Zellen, was auf eine Internalisierung der Mikropartikel hinweist. Um sicherzustellen, dass diese Internalisierung der Mikropartikel sich, abgesehen von THP-1 Zellen, auch auf andere phagozytosekompetente Zellen übertragen lässt und nicht spezifisch für eine Zellart ist, wurde der Versuch mit neutrophilen Granulozyten und zirkulierenden Mikropartikeln von gesunden Spendern wiederholt. Auch hier konnte eine Mikropartikel-spezifische Grünfärbung im Inneren der neutrophilen Granulozyten nach kurzer Zeit beobachtet werden. Insofern sind verschiedene Phagozyten in der Lage Mikropartikel schnell zu internalisieren.

IV.2 DIE ROLLE DER AKTIN-POLYMERISATION UND VON DYNAMIN BEI DER MIKROPARTIKEL-ZELL-INTERAKTION

Aktin ist eine wichtige treibende Kraft bei der Bildung von Vesikeln während der Endozytose. Es hat eine entscheidende Funktion in der Abschnürung von endozytotischen Vesikeln und bei deren Translokation ins Zytoplasma (Merrifield, Davids et al. 2004). Cytochalasin B ist ein Pilz-Metabolit, der die Aktin-Polymerisation und Pha-

Diskussion

gozytose inhibiert, indem es an die schnell wachsenden Enden der Aktin-Filamente (F-Aktin) bindet (Ryning and Remington 1978), (Davis, Estensen et al. 1971). Nach Hemmung der Aktin-Polymerisation durch Cytochalasin B war die Mikropartikel-Internalisierung deutlich reduziert. Auch in Thrombozyten verhindert Cytochalasin B den Anstieg von filamentösem F-Aktin, welcher eine Aktivierung von Thrombozyten begleitet (White, Burris et al. 1995). In konfokalmikroskopischen Untersuchungen konnten wir die Aufnahme der THP-1 Mikropartikel durch Thrombozyten nach Zugabe von Cytochalasin B inhibieren. Zusammenfassend deuten alle Ergebnisse daraufhin, dass eine durch Cytochalasin B vermittelte Hemmung der Aktinpolymerisation die Internalisierung von Mikropartikeln durch verschiedene Akzeptorzellen hemmt.

Dynamin vermittelt unter anderem die Abschnürung des endozytotischen Vesikels von der Plasmamembran bei verschiedenen Formen der Endozytose (z.B. Clathrin- und Caveolae-abhängig). Das Dynamin-Gen ist ein ca 100 kDa großes Protein und besteht aus 3 GTPase Domänen. Durch die gerichtete Mutagenese kann Lysin an Position 44 durch Alanin ersetzt werden und es entsteht die Dynamin-Mutante pcDNA3-Dynamin-K44A, welche die Ausbildung funktionsfähiger Dynamin-Helixstrukturen blockiert.

U-937 Zellen sind Makrophagen-Abkömmlinge mit einer hohen Phagozytosekapazität. In der konfokalen Laserscanmikroskopie konnten wir nachweisen, dass U-937 Zellen, die zuvor mit der Dynamin-Mutante K44A transfiziert worden waren im Vergleich zur Kontrolle fast keine Mikropartikel aufnahmen. Somit ist anzunehmen, dass Dynamin eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Mikropartikeln durch Phagozyten spielt.

IV.3 PHAGOZYTOTOSE VON MIKROPARTIKELN ÜBER DIE ERKENNUNG VON „EAT-ME“-SIGNALEN

Die Bildung von Mikropartikeln geht mit der Externalisierung von anionischen Phospholipiden wie PS durch die Translokation des Phospholipids von der inneren auf die äußere Plasmamembranseite einher. In der Tat haben Mikropartikel gemeinsame Eigenschaften mit apoptotischen Zellkörpern und sie können auch während des Vorgangs des programmierten Zelltodes entstehen. Apoptotische Zellen können durch

Diskussion

Phagozytose entfernt werden. Dabei erkennen Phagozyten PS- tragende Zellfragmente entweder direkt durch PS-Rezeptoren oder indirekt über Rezeptoren, die Proteine erkennen, die die Partikel zuvor opsonisiert haben (u.a. Protein S, Lactadherin, GAS6). Diese Rezeptoren könnten daher möglicherweise auch an der Clearance von Mikropartikeln beteiligt sein.

Nach Hemmung von bestimmten Oberflächenmolekülen, die für die Erkennung von apoptotischen Zellen durch Phagozyten von Bedeutung sind, beobachteten wir eine Reduktion der Mikropartikel-Aufnahme durch die Akzeptorzellen.

Annexin V ist ein 35-36 kD großes Protein, das Ca^{2+} -abhängig PS binden kann. Es ist bekannt, dass die Bindung von Annexin V an PS auf der Oberfläche von apoptotischen Zellkörpern deren Phagozytose hemmen kann (Callahan, Williamson et al. 2000), (Krahling, Callahan et al. 1999). Wir konnten zeigen, dass durch Präinkubation von Thrombozyten-Mikropartikeln mit Annexin V zusammen mit CaCl_2 die Internalisierung dieser Mikropartikel durch THP-1 Zellen inhibiert wurde.

Extrazelluläre Brückenmoleküle wie Calreticulin können durch die Interaktion mit der Oberfläche von apoptotischen Zellen deren Glykosylierungsmuster verändern und dadurch die Erkennung für Phagozyten erleichtern. Calreticulin bindet die Komplementkomponente C1q und mannose binding lectin (MBL) auf apoptotischen Zellen. Durch die zusätzliche Verknüpfung von Calreticulin mit CD91 (auch alpha-2-macroglobulin Rezeptor genannt) auf Makrophagen wird die Inkorporierung der apoptotischen Zellen durch Makrophagen stimuliert (Ogden, deCathelineau et al. 2001).

In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass die Internalisierung von Plättchen-Mikropartikeln durch THP-1 Zellen durch die Zugabe von Anti-Calreticulin-AK deutlich inhibiert wurde, was dafür spricht, dass auch die Aufnahme von Mikropartikeln durch Calreticulin vermittelt wird.

Das polypeptidische Antibiotikum Duramycin wird aus *Streptomyces cinnamomeus forma azacoluta* gewonnen. Es erkennt eine bestimmte Membrankonformation, die durch die Anwesenheit von Phosphatidylethanolamin oder Monogalactosyl diglyceride bestimmt wird (Navarro, Chabot et al. 1985). Durch die Zugabe von Duramycin wurde die Aufnahme der Mikropartikel in Akzeptorzellen gehemmt, was darauf hin-

Diskussion

deutet, dass Phosphatidylethanolamin für die Erkennung von Mikropartikeln durch Phagozyten mitverantwortlich ist.

Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass Mikropartikel durch Phagozyten erkannt und anschließend über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert werden können.

IV.4 INTERNALISIERUNG VON TF IN PLÄTTCHEN DURCH ENDOZYTÖSE TF-POSITIVER MIKROPARTIKEL

Nach der Aktivierung von Plättchen sind diese fähig, TF auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (Muller, Klocke et al. 2003), (Perez-Pujol, Aras et al. 2005). Dieser von Plättchen präsentierte TF könnte eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Thrombosen spielen.

Lange Zeit dachte man, TF wäre ausschließlich intramural im Blutgefäßsystem exprimiert, jedoch mehren sich die Beweise dafür, dass auch im Blut funktionell aktiver TF vorhanden ist, der eine intravasale Gerinnungsaktivierung möglich macht (Muller, Klocke et al. 2003), (Giesen, Rauch et al. 1999), (Mackman 2004). Dieser intravasale TF (iTf) wird auf der Oberfläche verschiedener aktivierter Blutzellen wie Monozyten und neutrophilen Granulozyten, vor allem jedoch auf zirkulierenden Mikropartikeln exprimiert (Nieuwland, Berckmans et al. 1997).

Mehrere Forschungsergebnisse zeigten, dass aktivierte Blutplättchen ebenfalls funktionell aktiven TF präsentieren können, obwohl sie selbst nicht in der Lage sind ihn herzustellen (Muller, Klocke et al. 2003), (Camera, Frigerio et al. 2003).

Es ist bekannt, dass Plättchen verschiedene Liganden internalisieren können, inklusive fremder Partikel (White and Clawson 1982), Bakterien (White 2005), Immunglobuline (Morgenstern, Ruf et al. 1992) und andere (White and Clawson 1981), (Behnke 1987). Interessanterweise können Plättchen ebenfalls intravenös injizierte Lipidvesikel internalisieren (Jarnvig, Naesh et al. 1990).

Möglicherweise erfolgt die Übertragung von TF auf Plättchen über die Endozytose TF-positiver Mikropartikel, die z.B. von Monozyten generiert wurden.

Andererseits wird postuliert, dass Plättchen auch funktionellen TF selbst synthetisieren und präsentieren könnten (Panes, Matus et al. 2007).

Durch konfokale Mikroskopie konnten wir die Interaktion von TF-positiven Monozyten-Mikropartikeln mit Plättchen analysieren.

Diskussion

Hierzu wurden zunächst die Plasmamembranen isolierter Thrombozyten mit Vybrant DiD gefärbt. Diese wurden anschließend mit DCF-gefärbten Mikropartikeln aus THP-1 Zellen inkubiert. Nach 30 min bei 37° ergab sich eine intrazelluläre Grünfärbung der Thrombozyten. Diese diffuse Grünfärbung der Zelle spräche am ehesten für eine Fusion, wobei denkbar ist, dass der wasserlösliche Farbstoff nach Internalisierung im Cytosol verdünnt wird. Um dies auszuschließen, wiederholten wir den Versuch mit einer membranständigen Färbung der Mikropartikel. Hierzu generierten wir Mikropartikel aus TF-CFP transfizierten CHO-Zellen. Wir konnten sehen, dass die TF-CFP-positiven Mikropartikel im Zytoplasma der Plättchen angereichert wurden. Dies deutet daraufhin, dass die Mikropartikel durch Endozytose internalisiert wurden.

Trotz der Durchführung von sogenannten Z-Stapeln (dreidimensionale Darstellung eines ausgewählten Thrombozyten durch Schnittebenen im kleinstmöglichen Abstand von $<1\ \mu\text{m}$) kann nicht abschließend beurteilt werden, ob die Mikropartikel von innen oder außen auf der Membran aufgelagert sind. Hierzu wäre es interessant den Versuch mit einer noch höheren Bildauflösung bspw. mittels Elektronenmikroskopie zu wiederholen.

Eine Arbeitsgruppe fand heraus, dass TF-reiche Lipid-Mikrovesikel von Plättchen in Kanäle des offenen kanalikulären Systems (OCS) endozytiert werden und im Zytoplasma und gelegentlich in den Alpha-Granula akkumulieren (White and Escolar 1991), (Escolar and White 2000), (White 1993), (Escolar, Lopez-Vilchez et al. 2008). Andererseits konnte anhand von dual color flow cytometry techniques ermittelt werden, dass TF-tragende Mikropartikel mit aktivierten Plättchen fusionieren (Del Conde, Shrimpton et al. 2005).

Genauerer Aufschluss über den Vorgang der Mikropartikel-Plättchen-Interaktion könnte auch dadurch erbracht werden, dass die Beteiligung bestimmter Rezeptoren und Liganden untersucht würden, die diese Prozesse vermitteln können.

Beispielsweise könnte CD15 im Transfer von Leukozyten-Partikeln auf Plättchen involviert sein (Falati, Gross et al. 2004), (Falati, Liu et al. 2003), (Rauch, Bonderman et al. 2000), (Lopez, Kearon et al. 2004).

IV.5 VERSCHIEDENE WEGE DER ZELLULÄREN INTERNALISIERUNG VON MIKROPARTIKELN

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Clearance von Mikropartikeln über verschiedene Wege der Endozytose/ Phagozytose erfolgt und bestimmte Oberflächenmarker, die die Erkennung apoptotischer Zellen vermitteln, auch bei der zellulären Internalisierung von Mikropartikeln von Bedeutung sind. Dies wird bestätigt durch Kawamoto et al., die ebenfalls eine Internalisierung von Mikropartikeln durch Endozytose beobachteten (Kawamoto, Ohga et al. 2012). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte eine Kollokalisierung von Tumor-Mikropartikeln an eingestülpten Plasmamembranen von Endothelzellen nachgewiesen werden. FACS-Analysen zeigten, dass Dynasore, ein spezifischer Dynamin-Inhibitor, die Internalisierung von Mikropartikeln durch die Akzeptorzellen hemmt.

Weiterhin könnten Mikropartikel durch das Immunsystem erkannt und anschließend über rezeptorvermittelte Endozytose von Makrophagen internalisiert werden. Lactadherin ist ein Makrophagen-Opsonin, das die Clearance von apoptotischen Lymphozyten vermittelt. Es wurde postuliert, dass Lactadherin auch ein Mediator für die Phagozytose von PS-präsentierenden Plättchen-Mikrovesikeln sein könnte (Dasgupta, Abdel-Monem et al. 2009), (Rautou and Mackman).

Plättchen-Mikropartikel werden möglicherweise von der Komplement-Komponente C3b opsonisiert, bevor sie an Erythrozyten binden und schließlich Phagozyten in Leber und Lunge transferiert werden (Flaumenhaft 2006). Anschließend könnten sie über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (Hess and Schifferli 2003). Die Exposition von PS auf der Oberfläche von Mikropartikeln könnte hierbei die Opsonisierung über C3 unterstützen und somit die Komplementkaskade aktivieren (Flaumenhaft 2006). Außerdem könnten Mikropartikel auch mit apoptotischen Zellen um die PS-Rezeptoren auf Makrophagen konkurrieren. Demnach würde eine erhöhte Anzahl an Mikropartikeln zu einer verringerten Phagozytose von apoptotischen Zellkörpern führen (Antwi-Baffour, Kholia et al. 2010).

Des Weiteren könnte beta2-Glycoprotein I wichtig für die Clearance von Zellmembranen mit prokoagulatorisch wirksamen anionischen Phospholipiden sein, indem es die Bindung von negativ geladenen Oberflächen inklusive anionischen Phospholipid-Vesikeln, Plättchen, apoptotischen Zellen und Plättchen-Mikrovesikeln mit THP-1 Zellen stimuliert. Der Komplex aus anionischen Phospholipid-Vesikeln und beta2-

Diskussion

Glykoprotein I wird von Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen erkannt und über einen Rezeptor-vermittelten Weg aufgenommen. Diese Bindung geht einher mit der Inkorporierung von Phospholipiden in die Zellmembran und Internalisierung von beta2-Glykoprotein I (Thiagarajan, Le et al. 1999). Bei Patienten mit Anti-Phospholipid-Antikörper-Syndrom sind die meisten Antikörper gegen beta2-Glycoprotein I gerichtet. Die Bindung von beta2-Glycoprotein I an PS-tragende Plättchen-Mikropartikel könnte ihre Clearance durch Phagozytose begünstigen und Antikörper gegen beta2-Glycoprotein könnten somit indirekt die Gerinnungsaktivität erhöhen könnten (Abdel-Monem, Dasgupta et al. 2010).

In vitro zeigte sich eine große Redundanz der Phagozytenrezeptoren in Säugetieren, weil auch die Hemmung multipler Rezeptoren zu keiner kompletten Inhibierung der Aufnahme von extrazellulärem Material führte (Scott, McMahon et al. 2001), (Fadok, Bratton et al. 2001), (Henson, Bratton et al. 2001), (Savill, Dransfield et al. 2002). Möglicherweise sind multiple Rezeptor-Ligand-Interaktionen für eine vollständige Phagozytose erforderlich. Diese Mechanismen variieren jedoch vermutlich je nach Phagozytenzelltyp und nach deren Aktivierungszustand.

Zusätzlich zur Interaktion von Mikropartikeln durch Endozytose/Phagozytose könnte die Internalisierung der Mikropartikel auch durch Fusion erfolgen (Whale, Beskorwayne et al. 2006).

Möglicherweise gibt es verschiedene Wege der Mikropartikel-Internalisierung in Zellen, abhängig von der Art der Mikropartikel und ihrer Entstehung unter verschiedenen pathophysiologischen Gegebenheiten. Es wäre denkbar, dass dementsprechend unterschiedliche Signalwege über das Schicksal der verschiedenen Mikropartikel-Populationen entscheiden.

IV.6 AUSBLICK

Eine defekte Clearance von Mikropartikeln kann eine Vielzahl biologischer Nebeneffekte nachziehen, so z.B. eine Suppression des Immunsystems und eine erhöhte Thrombosetendenz.

Unsere Erkenntnisse über die Entstehung und die Clearance von Mikropartikeln könnten daher nicht nur zur Aufklärung der Pathogenese kardiovaskulärer Erkran-

Diskussion

kungen beitragen, sondern auch Konsequenzen für Prävention, Diagnostik und Therapie diverser Erkrankungen haben (Diamant, Tushuizen et al. 2004).

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit einer erhöhten Zahl an Mikropartikeln im zirkulierenden Blut einher. Es ist daher prinzipiell möglich, die Zahl und die zelluläre Parvenienz der Mikropartikel als Biomarker für kardiovaskuläre Pathologien der Patienten beziehungsweise als Indikatoren des individuellen thrombotischen Risikos zu nutzen (Morel, Morel et al. 2006).

Einige der aktuell verwendeten Medikamente beeinflussen bekanntermaßen die Generierung von Mikropartikeln. So ist der Glycoprotein IIb-IIIa- Rezeptor-Antagonist Abciximab, derzeit als ein Plättchenaggregationshemmer verwendet, auch ein starker Inhibitor der Plättchen-Vesikelbildung in vitro (Reverter, Beguin et al. 1996). Demnach könnte dessen antithrombotischer Effekt zusätzlich zu der Plättchenaggregationshemmung über eine verminderte Mikropartikel-Bildung zustande kommen (Aupeix, Toti et al. 1996; Aupeix, Toti et al. 1996)). Ein Mangel an Cholesterin reduziert die Aktivität Raft-assoziiierter Proteine, inklusive TF, und setzt die Freisetzung von Mikropartikeln herab. Somit könnte über eine Hemmung der Mikropartikel-Freisetzung möglicherweise die antithrombotische Wirkung von Statinen erklärt werden (Del Conde, Shrimpton et al. 2005).

Der Transfer von TF positiven Leukozyten-Partikeln auf Plättchen ist abhängig von der Interaktion von CD15 mit Plättchen und TF selbst. Ein neuer therapeutischer Ansatz könnte den Transfer von TF auf Plättchen inhibieren, indem die Interaktion von CD 15 mit P-Selektin sowie die Interaktion mit TF selbst antagonisiert würde (Rauch, Bonderman et al. 2000). Andererseits könnte auch die Transfusion von Mikropartikeln bei Patienten mit hämorrhagischer Diathese an Bedeutung gewinnen. Auch in der Onkologie spielen Mikropartikel eine entscheidende Rolle. Die Mikropartikel-Level korrelieren mit der Tumorgröße, somit könnten sie beispielsweise beim Mammakarzinom zukünftig eine relevante Bedeutung als Biomarker für verschiedene Tumorstadien erhalten (Toth, Nieuwland et al. 2008).

TF auf Tumoren und Mikropartikeln fördert sowohl das Überleben als auch das Wachstum des Tumors (Coughlin and Camerer 2003). Daher können TF-hemmende Antikörper in Mäusen mit Tumoren die Tumorgröße und die Anzahl an Metastasen deutlich reduzieren (Yu, May et al. 2008).

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Internalisierung von Mikropartikeln untersucht, die aus Blutzellen gewonnen wurden.

Um zu prüfen, ob Mikropartikel über Endozytose internalisiert werden, wurde eine Methode angewandt, die es ermöglichte, den intravesikulären pH zu messen. Hierbei zeigte sich ein Ausgangs-pH-Wert der Mikropartikel von 7,2. Dieser Wert entspricht dem zytosolischen pH-Wert der Ursprungszelle. Nach Inkubation der Mikropartikel mit THP-1 Zellen kam es zu einer Reduktion des intravesikulären pH-Wertes. Diese pH-Abnahme spricht dafür, dass Mikropartikel mit sauren zytosolischen Kompartimenten wie Endosomen oder Lysosomen in der Akzeptorzelle verschmelzen.

Durch die Zugabe von Cytochalasin B, das die Endozytose hemmt, konnte eine Reduzierung der pH-Abnahme festgestellt werden. Auch war die pH-Abnahme bei 4°C inhibiert. Somit zeigte sich, dass Mikropartikel durch endozytotische Prozesse in Akzeptorzellen aufgenommen werden.

Mittels konfokaler Laserscanmikroskopie wurden die Interaktionen von Mikropartikeln mit Empfängerzellen visualisiert. Auch hier konnten wir eine Internalisierung von Mikropartikeln durch THP-1 Zellen feststellen. Diese Aufnahme konnte durch den Endozytose-Hemmstoff Cytochalasin B inhibiert werden.

Zusätzlich beobachteten wir, dass es nach Zugabe von Inhibitoren gegen Oberflächenmarker von apoptotischen Zellen (Anti-Calreticlin-AK, Duramycin und Annexin V), zu einer geringeren Internalisierung der Mikropartikel durch Makrophagen kam. Daher ist anzunehmen, dass Mikropartikel durch ihre Oberflächenveränderungen von professionellen Phagozyten erkannt und aufgenommen werden können.

Die Visualisierung der Interaktion von Thrombozyten mit Mikropartikeln mittels Laserscanmikroskopie zeigte, dass die Mikropartikel mit hoher Wahrscheinlichkeit in die Thrombozyten aufgenommen werden. Dies wurde durch den Endozytosehemmer Cytochalasin B gehemmt.

Die Ergebnisse deuten zusammenfassend darauf hin, dass die zelluläre Clearance von Mikropartikeln über verschiedene Wege der Endozytose/ Phagozytose erfolgt und durch Oberflächenmarker wie Calreticulin und die Exposition von Aminophospholipiden vermittelt wird.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Monem, H., S. K. Dasgupta, et al. (2010). "Phagocytosis of platelet microvesicles and beta2- glycoprotein I." Thromb Haemost **104**(2).
- Aderem, A. (2003). "Phagocytosis and the inflammatory response." J Infect Dis **187 Suppl 2**: S340-345.
- Albrecht, S., M. Kotzsch, et al. (1996). "Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population." Thromb Haemost **75**(5): 772-777.
- Allen, C. N., E. S. Harpur, et al. (1990). "Efflux of bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF) by a novel ATP-dependent transport mechanism in epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **172**(1): 262-267.
- Antonyak, M. A., B. Li, et al. (2011). "Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 4852-4857.
- Antwi-Baffour, S., S. Kholia, et al. (2010). "Human plasma membrane-derived vesicles inhibit the phagocytosis of apoptotic cells - Possible role in SLE." Biochem Biophys Res Commun.
- Aupeix, K., F. Toti, et al. (1996). "Oxysterols induce membrane procoagulant activity in monocytic THP-1 cells." Biochem J **314**(Pt 3): 1027-1033.
- Aupeix, K., F. Toti, et al. (1996). "Oxysterols induce membrane procoagulant activity in monocytic THP-1 cells." Biochem J **314** (Pt 3): 1027-1033.
- Bach, R. R. (2006). "Tissue factor encryption." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(3): 456-461.
- Barry, O. P. and G. A. FitzGerald (1999). "Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles." Thromb Haemost **82**(2): 794-800.
- Barry, O. P., D. Pratico, et al. (1997). "Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles." J Clin Invest **99**(9): 2118-2127.
- Barz, D., M. Goppelt, et al. (1985). "Characterization of cellular and extracellular plasma membrane vesicles from a non-metastasizing lymphoma (Eb) and its metastasizing variant (ESb)." Biochim Biophys Acta **814**(1): 77-84.
- Beaudoin, A. R. and G. Grondin (1991). "Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena." Biochim Biophys Acta **1071**(3): 203-219.
- Behnke, O. (1987). "Surface membrane clearing of receptor-ligand complexes in human blood platelets." J Cell Sci **87** (Pt 3): 465-472.
- Berckmans, R. J., R. Neuwland, et al. (2001). "Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation." Thromb Haemost **85**(4): 639-646.
- Bervers, E. M., T. Wiedmer, et al. (1992). "Defective Ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome." Blood **79**(2): 380-388.
- Biro, E., J. W. Akkerman, et al. (2005). "The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions." J Thromb Haemost **3**(12): 2754-2763.
- Biro, E., K. N. Sturk-Maquelin, et al. (2003). "Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner." J Thromb Haemost **1**(12): 2561-2568.

Literaturverzeichnis

- Bogdanov, V. Y., V. Balasubramanian, et al. (2003). "Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein." Nat Med **9**(4): 458-462.
- Brown, S., I. Heinisch, et al. (2002). "Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment." Nature **418**(6894): 200-203.
- Callahan, M. K., P. Williamson, et al. (2000). "Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes." Cell Death Differ **7**(7): 645-653.
- Camera, M., M. Frigerio, et al. (2003). "Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(9): 1690-1696.
- Camerer, E., A. B. Kolsto, et al. (1996). "Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation." Thromb Res **81**(1): 1-41.
- Celi, A., G. Pellegrini, et al. (1994). "P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8767-8771.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." Trends Cell Biol **19**(2): 43-51.
- Combes, V., A. C. Simon, et al. (1999). "In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant." J Clin Invest **104**(1): 93-102.
- Coughlin, S. R. and E. Camerer (2003). "PARticipation in inflammation." J Clin Invest **111**(1): 25-27.
- Dachary-Prigent, J., J. M. Pasquet, et al. (1995). "Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca²⁺-ATPase inhibitors." Biochemistry **34**(36): 11625-11634.
- Dainiak, N., M. A. Riordan, et al. (1988). "Contractile proteins participate in release of erythroid growth regulators from mononuclear cells." Blood **72**(1): 165-171.
- Dasgupta, S. K., H. Abdel-Monem, et al. (2009). "Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles." Blood **113**(6): 1332-1339.
- Davila, M., A. Amirkhosravi, et al. (2008). "Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation." J Thromb Haemost **6**(9): 1517-1524.
- Davis, A. T., R. Estensen, et al. (1971). "Cytochalasin B. 3. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis." Proc Soc Exp Biol Med **137**(1): 161-164.
- Del Conde, I., C. N. Shrimpton, et al. (2005). "Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation." Blood **106**(5): 1604-1611.
- Dessy, C., R. A. Kelly, et al. (2000). "Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alteration in NO signaling." EMBO J **19**(16): 4272-4280.
- Diamant, M., R. Nieuwland, et al. (2002). "Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus." Circulation **106**(19): 2442-2447.
- Diamant, M., M. E. Tushuizen, et al. (2004). "Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease?" Eur J Clin Invest **34**(6): 392-401.
- Diehl, P., F. Nagy, et al. (2008). "Increased levels of circulating microparticles in patients with severe aortic valve stenosis." Thromb Haemost **99**(4): 711-719.

Literaturverzeichnis

- Drake, T. A., J. H. Morrissey, et al. (1989). "Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis." Am J Pathol **134**(5): 1087-1097.
- Draper, M. P., R. L. Martell, et al. (1997). "Active efflux of the free acid form of the fluorescent dye 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein in multidrug-resistance-protein-overexpressing murine and human leukemia cells." Eur J Biochem **243**(1-2): 219-224.
- Eilertsen, K. E. and B. Osterud (2005). "The role of blood cells and their microparticles in blood coagulation." Biochem Soc Trans **33**(Pt 2): 418-422.
- Engelmann, B., T. Luther, et al. (2003). "Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel." Thromb Haemost **89**(1): 3-8.
- Escolar, G., I. Lopez-Vilchez, et al. (2008). "Internalization of tissue factor by platelets." Thromb Res **122 Suppl 1**: S37-41.
- Escolar, G. and J. G. White (2000). "Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between in vitro and in vivo studies." Thromb Haemost **83**(3): 371-386.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2001). "Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences." J Clin Invest **108**(7): 957-962.
- Fadok, V. A. and G. Chimini (2001). "The phagocytosis of apoptotic cells." Semin Immunol **13**(6): 365-372.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-2216.
- Falati, S., P. L. Gross, et al. (2004). "In vivo models of platelet function and thrombosis: study of real-time thrombus formation." Methods Mol Biol **272**: 187-197.
- Falati, S., Q. Liu, et al. (2003). "Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin." J Exp Med **197**(11): 1585-1598.
- Faure, V., L. Dou, et al. (2006). "Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure." J Thromb Haemost **4**(3): 566-573.
- Flaumenhaft, R. (2006). "Formation and fate of platelet microparticles." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 182-187.
- Fontana, V., W. Jy, et al. (2008). "Increased procoagulant cell-derived microparticles (C-MP) in splenectomized patients with ITP." Thromb Res **122**(5): 599-603.
- Fourcade, O., M. F. Simon, et al. (1995). "Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells." Cell **80**(6): 919-927.
- Franc, N. C. (2002). "Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster: molecular mechanisms and physiological consequences." Front Biosci **7**: d1298-1313.
- Frey, B. and U. S. Gaipl (2011). "The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles." Semin Immunopathol **33**(5): 497-516.
- Freyssinet, J. M. (2003). "Cellular microparticles: what are they bad or good for?" J Thromb Haemost **1**(7): 1655-1662.
- Gardai, S. J., K. A. McPhillips, et al. (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." Cell **123**(2): 321-334.

Literaturverzeichnis

- George, J. N., E. B. Pickett, et al. (1986). "Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery." J Clin Invest **78**(2): 340-348.
- George, J. N., L. L. Thoi, et al. (1982). "Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum." Blood **60**(4): 834-840.
- Giesen, P. L., U. Rauch, et al. (1999). "Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2311-2315.
- Gilbert, G. E., P. J. Sims, et al. (1991). "Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII." J Biol Chem **266**(26): 17261-17268.
- Ginestra, A., M. D. La Placa, et al. (1998). "The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness." Anticancer Res **18**(5A): 3433-3437.
- Greenberg, S. and S. Grinstein (2002). "Phagocytosis and innate immunity." Curr Opin Immunol **14**(1): 136-145.
- Hanayama, R., M. Tanaka, et al. (2002). "Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes." Nature **417**(6885): 182-187.
- Henson, P. M., D. L. Bratton, et al. (2001). "Apoptotic cell removal." Curr Biol **11**(19): R795-805.
- Hess, C. and J. A. Schifferli (2003). "Immune adherence revisited: novel players in an old game." News Physiol Sci **18**: 104-108.
- Hirohashi, T., T. Terasaki, et al. (1997). "In vivo and in vitro evidence for nonrestricted transport of 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester at the blood-brain barrier." J Pharmacol Exp Ther **280**(2): 813-819.
- Hong, B. S., J. H. Cho, et al. (2009). "Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells." BMC Genomics **10**: 556.
- Huber, H., M. J. Polley, et al. (1968). "Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulin G." Science **162**(859): 1281-1283.
- Hugel, B., M. C. Martinez, et al. (2005). "Membrane microparticles: two sides of the coin." Physiology (Bethesda) **20**: 22-27.
- Jarnvig, I. L., O. Naesh, et al. (1990). "Platelet responses to intravenous infusion of Intralipid in healthy volunteers." Am J Clin Nutr **52**(4): 628-631.
- Jy, W., J. J. Jimenez, et al. (2002). "Agonist-induced capping of adhesion proteins and microparticle shedding in cultures of human renal microvascular endothelial cells." Endothelium **9**(3): 179-189.
- Kawamoto, T., N. Ohga, et al. (2012). "Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis." PLoS One **7**(3): 30.
- Kelton, J. G., T. E. Warkentin, et al. (1992). "Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles." Blood **80**(9): 2246-2251.
- Kosaka, N., H. Iguchi, et al. (2010). "Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis." Cancer Sci **101**(10): 2087-2092.
- Kosaka, N., H. Iguchi, et al. (2010). "Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells." J Biol Chem **285**(23): 17442-17452.

Literaturverzeichnis

- Koyama, T., K. Nishida, et al. (1994). "Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance." Br J Haematol **87**(2): 343-347.
- Krahling, S., M. K. Callahan, et al. (1999). "Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages." Cell Death Differ **6**(2): 183-189.
- Lauber, K., E. Bohn, et al. (2003). "Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal." Cell **113**(6): 717-730.
- Lee, D. H., T. E. Warkentin, et al. (1996). "A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry." Br J Haematol **95**(4): 724-731.
- Liu, M. L. and K. J. Williams (2012). "Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **19**(2): 121-127.
- Lopez, J. A., C. Kearon, et al. (2004). "Deep venous thrombosis." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 439-456.
- Mack, M., A. Kleinschmidt, et al. (2000). "Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection." Nat Med **6**(7): 769-775.
- Mackman, N. (2004). "Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1015-1022.
- Mallat, Z., H. Benamer, et al. (2000). "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes." Circulation **101**(8): 841-843.
- Mallat, Z., B. Hugel, et al. (1999). "Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity." Circulation **99**(3): 348-353.
- Martinez, M. C., A. Tesse, et al. (2005). "Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(3): H1004-1009.
- Mause, S. F. and C. Weber (2010). "Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange." Circ Res **107**(9): 1047-1057.
- Mayor, S. and R. E. Pagano (2007). "Pathways of clathrin-independent endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 603-612.
- Merrifield, C. J. (2004). "Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis." Trends Cell Biol **14**(7): 352-358.
- Merrifield, J. D., W. G. Davids, et al. (2004). "Uptake of mercury by thiol-grafted chitosan gel beads." Water Res **38**(13): 3132-3138.
- Misumi, K., H. Ogawa, et al. (1998). "Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris." Am J Cardiol **81**(1): 22-26.
- Moffatt, O. D., A. Devitt, et al. (1999). "Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes." J Immunol **162**(11): 6800-6810.
- Moosbauer, C., E. Morgenstern, et al. (2007). "Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure." Blood **109**(3): 995-1002.
- Morel, N., O. Morel, et al. (2006). "[Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes]." Ann Fr Anesth Reanim **25**(9): 955-966.
- Morel, O., B. Hugel, et al. (2004). "Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous

Literaturverzeichnis

-
- transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists." J Thromb Haemost **2**(7): 1118-1126.
- Morel, O., F. Toti, et al. (2006). "Procoagulant microparticles: 'criminal partners' in atherothrombosis and deleterious cellular exchanges." Pathophysiol Haemost Thromb **35**(1-2): 15-22.
- Morgenstern, E., A. Ruf, et al. (1992). "Transport of anti-glycoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alpha-granules of unstimulated human blood platelets." Thromb Haemost **67**(1): 121-125.
- Muller, I., A. Klocke, et al. (2003). "Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets." Faseb J **17**(3): 476-478.
- Muralidharan-Chari, V., J. W. Clancy, et al. (2010). "Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression." J Cell Sci **123**(Pt 10): 1603-1611.
- Nagata, K., K. Ohashi, et al. (1996). "Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases." J Biol Chem **271**(47): 30022-30027.
- Najafi-Shoushtari, S. H., F. Kristo, et al. (2010). "MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis." Science **328**(5985): 1566-1569.
- Navarro, J., J. Chabot, et al. (1985). "Interaction of duramycin with artificial and natural membranes." Biochemistry **24**(17): 4645-4650.
- Nieuwland, R., R. J. Berckmans, et al. (1997). "Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant." Circulation **96**(10): 3534-3541.
- Nishiya, T. and C. Toma (2004). "Interaction of platelets with liposomes containing dodecapeptide sequence from fibrinogen." Thromb Haemost **91**(6): 1158-1167.
- Ogden, C. A., A. deCathelineau, et al. (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." J Exp Med **194**(6): 781-795.
- Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, et al. (2000). "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." Science **288**(5473): 2051-2054.
- Osterud, B. and E. Bjorklid (2001). "The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation." Semin Thromb Hemost **27**(6): 605-617.
- Paidassi, H., P. Tacnet-Delorme, et al. (2011). "Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition." J Mol Biol **408**(2): 277-290.
- Panes, O., V. Matus, et al. (2007). "Human platelets synthesize and express functional tissue factor." Blood **109**(12): 5242-5250.
- Pasquet, J. M., J. Dachary-Prigent, et al. (1996). "Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets." Eur J Biochem **239**(3): 647-654.
- Pendurthi, U. R. and L. V. Rao (2008). "Role of tissue factor disulfides and lipid rafts in signaling." Thromb Res **122 Suppl 1**: S14-18.
- Perez-Pujol, S., O. Aras, et al. (2005). "Stored platelets contain residual amounts of tissue factor: evidence from studies on platelet concentrates stored for prolonged periods." Transfusion **45**(4): 572-579.
- Platt, N., R. P. da Silva, et al. (1998). "Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells." Biochem Soc Trans **26**(4): 639-644.

Literaturverzeichnis

- Rand, M. L., H. Wang, et al. (2006). "Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits." J Thromb Haemost **4**(7): 1621-1623.
- Rauch, U., D. Bonderman, et al. (2000). "Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor." Blood **96**(1): 170-175.
- Rautou, P. E. and N. Mackman Deletion of microvesicles from the circulation, Circulation. 2012 Apr 3;125(13):1601-4. Epub 2012 Mar 2.
- Raymond, A. D., T. C. Campbell-Sims, et al. (2011). "HIV Type 1 Nef is released from infected cells in CD45(+) microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals." AIDS Res Hum Retroviruses **27**(2): 167-178.
- Raynal, P. and H. B. Pollard (1994). "Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins." Biochim Biophys Acta **1197**(1): 63-93.
- Raz, A. and B. Geiger (1982). "Altered organization of cell-substrate contacts and membrane-associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities." Cancer Res **42**(12): 5183-5190.
- Reinhardt, C., M. L. von Bruhl, et al. (2008). "Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation." J Clin Invest **118**(3): 1110-1122.
- Reverter, J. C., S. Beguin, et al. (1996). "Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". J Clin Invest **98**(3): 863-874.
- Reynolds, H. Y., J. A. Kazmierowski, et al. (1975). "Specificity of opsonic antibodies to enhance phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by human alveolar macrophages." J Clin Invest **56**(2): 376-385.
- Ryning, F. W. and J. S. Remington (1978). "Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry." Infect Immun **20**(3): 739-743.
- Sabatier, F., P. Darmon, et al. (2002). "Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles." Diabetes **51**(9): 2840-2845.
- Sabatier, F., V. Roux, et al. (2002). "Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity." Blood **99**(11): 3962-3970.
- Sadallah, S., C. Eken, et al. (2008). "Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties." J Leukoc Biol **84**(5): 1316-1325.
- Satta, N., F. Toti, et al. (1994). "Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide." J Immunol **153**(7): 3245-3255.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-975.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-788.
- Schroen, B. and S. Heymans (2012). "Small but smart--microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing." Cardiovasc Res **93**(4): 605-613.
- Schwartz, H., N. D. Tolley, et al. (2006). "Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets." J Exp Med **203**(11): 2433-2440.

Literaturverzeichnis

- Scott, R. S., E. J. McMahon, et al. (2001). "Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER." Nature **411**(6834): 207-211.
- Sims, P. J. and T. Wiedmer (2001). "Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling." Thromb Haemost **86**(1): 266-275.
- Sims, P. J., T. Wiedmer, et al. (1989). "Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity." J Biol Chem **264**(29): 17049-17057.
- Steppich, B., C. Mattisek, et al. (2005). "Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction." Thromb Haemost **93**(1): 35-39.
- Suefuji, H., H. Ogawa, et al. (1997). "Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction." Am Heart J **134**(2 Pt 1): 253-259.
- Tesselaar, M. E., F. P. Romijn, et al. (2007). "Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?" J Thromb Haemost **5**(3): 520-527.
- Thiagarajan, P., A. Le, et al. (1999). "Beta(2)-glycoprotein I promotes the binding of anionic phospholipid vesicles by macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(11): 2807-2811.
- Toth, B., R. Nieuwland, et al. (2008). "Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers." Anticancer Res **28**(2A): 1107-1112.
- Valenti, R., V. Huber, et al. (2007). "Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression." Cancer Res **67**(7): 2912-2915.
- van der Blik, A. M., T. E. Redelmeier, et al. (1993). "Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation." J Cell Biol **122**(3): 553-563.
- van Deurs, B., K. Roepstorff, et al. (2003). "Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean." Trends Cell Biol **13**(2): 92-100.
- Vandivier, R. W., C. A. Ogden, et al. (2002). "Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex." J Immunol **169**(7): 3978-3986.
- VanWijk, M. J., E. VanBavel, et al. (2003). "Microparticles in cardiovascular diseases." Cardiovasc Res **59**(2): 277-287.
- Vickers, K. C. and A. T. Remaley (2012). "Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication." Curr Opin Lipidol **23**(2): 91-97.
- Whale, T. A., T. K. Beskorwayne, et al. (2006). "Bovine polymorphonuclear cells passively acquire membrane lipids and integral membrane proteins from apoptotic and necrotic cells." J Leukoc Biol **79**(6): 1226-1233.
- White, J. G. (1972). "Uptake of latex particles by blood platelets: phagocytosis or sequestration?" Am J Pathol **69**(3): 439-458.
- White, J. G. (1993). "Functional significance of mobile receptors on human platelets." Arterioscler Thromb **13**(8): 1236-1243.
- White, J. G. (2005). "Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system." Platelets **16**(2): 121-131.
- White, J. G., S. Burris, et al. (1995). "Relationship of actin filament assembly to clearance of fibrinogen gold, GPIIb-IIIa complexes on spread platelets." Eur J Clin Invest **25**(4): 241-249.

Literaturverzeichnis

-
- White, J. G. and C. C. Clawson (1981). "Effects of large latex particle uptake of the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study." Ultrastruct Pathol **2**(3): 277-287.
- White, J. G. and C. C. Clawson (1982). "Effects of small latex particle uptake on the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study." Diagn Histopathol **5**(1): 3-10.
- White, J. G. and G. Escolar (1991). "The blood platelet open canalicular system: a two-way street." Eur J Cell Biol **56**(2): 233-242.
- Wolf, P. (1967). "The nature and significance of platelet products in human plasma." Br J Haematol **13**(3): 269-288.
- Yu, J., L. May, et al. (2008). "Contribution of host-derived tissue factor to tumor neovascularization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(11): 1975-1981.
- Zhang, Y., D. Liu, et al. (2010). "Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration." Mol Cell **39**(1): 133-144.
- Zillmann, A., T. Luther, et al. (2001). "Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation." Biochem Biophys Res Commun **281**(2): 603-609.
- Zumbach, M., M. Hofmann, et al. (1997). "Tissue factor antigen is elevated in patients with microvascular complications of diabetes mellitus." Exp Clin Endocrinol Diabetes **105**(4): 206-212.
- Zwaal, R. F., P. Comfurius, et al. (2004). "Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids." Biochim Biophys Acta **22**: 2-3.
- Zwaal, R. F., P. Comfurius, et al. (2005). "Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells." Cell Mol Life Sci **62**(9): 971-988.
- Zwaal, R. F. and A. J. Schroit (1997). "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells." Blood **89**(4): 1121-1132.

VII. ANHANG

VII.1 DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin-Förderung von Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann am Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums Großhadern.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Engelmann für die Themastellung und die exzellente Förderung der Arbeit.

Herrn Professor Heesemann danke ich für die wunderbare Organisation des Promotionsstudiengangs.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die vielen wertvollen Anregungen und die Hilfsbereitschaft während den zahlreichen gemeinsamen Arbeitsstunden im Labor.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums in jeder Hinsicht und uneingeschränkt unterstützt hat.